

**Zum Vorkommen von Prion Proteinen
in der Milchdrüse und der Milch
von Hauswiederkäuern**

Ricarda Gebert

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Peter Märtlbauer
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Prionen	3
2.1.1	Terminologie, Struktur und Eigenschaften der Prionen	3
2.2	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	7
2.2.1	Scrapie.....	8
2.2.2	BSE.....	8
2.3	Vorkommen von Prion Protein	9
2.3.1	Vorkommen und Verteilung von PrP ^C im Gesamtorganismus	9
2.3.2	Mögliche Funktion des PrP ^C	10
2.3.3	Ausbreitung von PrP ^{Sc} im infizierten Organismus.....	12
2.3.4	Anatomie und Physiologie der Milchdrüse und Nachweis von PrP ^C in Milch	15
2.3.5	Bisherige Untersuchungen zur Übertragbarkeit von TSE durch Milch bzw. Eutergewebe.....	17
2.4	Nachweismöglichkeiten für PrP	18
2.4.1	Immunochemische Tests in der Diagnostik	18
2.4.2	Histopathologie und Immunhistochemie	20
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Materialien und Geräte	22
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	22
3.1.2	Immunreagenzien	23
3.1.3	Lösungen und Puffer	23
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.5	Geräte	26
3.2	Milch- und Eutergewebeproben.....	28
3.2.1	Proben klinisch gesunder Tiere	28
3.2.2	Proben TSE-infizierter Tiere	29
3.2.3	Kontrollmaterial für Western-Blot und EIA.....	29

3.3	Für die immunchemischen Methoden verwendeten Antikörper.....	30
3.4	Methoden.....	32
3.4.1	Herstellung der Homogenate aus Hirn- und Eutergewebe.....	32
3.4.2	Milchaufarbeitung	33
3.4.3	Etablierung eines Protokolls zur Rahmaufarbeitung	34
3.4.4	Verdau mit Proteinase K.....	36
3.4.5	Modifikationen der Aufarbeitung von Molke für den Einsatz im Western- Blot	36
3.4.6	Sandwich-EIA.....	37
3.4.7	Darstellung von PrP ^C /PrP ^{res} mittels Western-Blot.....	38
3.4.8	SDS-PAGE mit Tris/Tricine-Gel und Coomassie-Färbung zur Detektion trunkierter PrP-Formen.....	39
3.4.9	Analyse von Rahmproben mittels PrionScreen®	39
3.4.10	Immunhistochemischer Nachweis von PrP ^C	40
3.4.11	Immunhistochemischer Nachweis von PrP ^{res}	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Vergleichende Darstellung des PrP ^C -Vorkommens in Eutergewebe und Milch bei Rind, Schaf und Ziege.....	42
4.1.1	PrP ^C -Expression im Eutergewebe.....	42
4.1.1.1	Sandwich-EIA.....	42
4.1.1.2	Western-Blot.....	43
4.1.1.3	Immunhistochemie	45
4.1.2	PrP ^C -Gehalte in der Milch.....	48
4.1.2.1	Spezies-spezifisches Vorkommen von PrP ^C in Milchfraktionen der Hauswiederkäuer.....	48
4.1.2.2	Vorkommen von PrP ^C in Milchfraktionen des Rindes.....	48
4.1.2.3	Vorkommen von PrP ^C in Milchfraktionen des Schafes	50
4.1.2.4	Vorkommen von PrP ^C in Milchfraktionen der Ziege.....	53
4.1.3	PrP ^C - Gehalte im Laktationsverlauf beim Schaf	57

4.2	Etablierung eines Aufarbeitungsverfahrens für Proteine aus der Rahmfraktion	61
4.2.1	Tierartlich-vergleichendes Vorkommen von PrP ^C im Rahm	62
4.3	Untersuchung auf PrP ^{res} in Eutergewebe und Milch bei TSE-infizierten Rindern und Schafen.....	63
4.3.1	Ergebnisse bei BSE-infizierten Rindern	63
4.3.2	Ergebnisse in Milch von TSE infizierten Schafen mittels der neu-etablierten Aufarbeitung	67
4.3.3	Ergebnisse in Milch von TSE infizierten Schafe mittels Aufarbeitung im PrionScreen®	69
5	Diskussion	73
5.1	Detektion von PrP ^C in Eutergewebe und Milch von Hauswiederkäuern.....	73
5.2	Methodenetablierung der Aufarbeitung von PrP im Rahm und Ergebnisse ..	79
5.3	Nachweis von PrP ^{res} in der Milch von TSE-infizierten Schafen	79
5.4	Ergebnisse bei klinisch erkrankten BSE-Rindern	82
5.5	Fazit.....	82
6	Zusammenfassung/Summary	84
7	Literaturverzeichnis	88
8	Anhang	120

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest.	aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Disease (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay (Enzymimmuntest)
ENS	Enterisches Nervensystem
FCS	fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
GALT	darmschleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe (gut-associated lymphatic tissue)
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IHC	Immunhistochemie
Lnn.	Lymphonodi
LRS	Lymphoretikuläres System
mAk	monoklonaler Antikörper
Med. obl.	Medulla oblongata
MOPS	γ -Morpholino-propansulfonsäure
n. d.	nicht durchgeführt/durchführbar
NMR	nuclear magnetic resonance
N. vagus	Nervus vagus
OD	optical density
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit (<i>früher</i> : Office International des Epizooties)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PK	Proteinase K
Pro	Prolin
prnp ^{0/0} -Tiere	Prion Protein Knockout-Tiere
PrP	Prion Protein
PrP ^C	zelluläres Prion Protein

PrP ^{res}	Proteinase K resistentes PrP
PrP ^{Sc}	TSE-assoziiertes Prion Protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SAFs	Scrapie assoziierte Fibrillen
sCJD	sporadische Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDS	Natriumduodecylsulfat (Sodium dodecylsulfat)
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien
vCJD	neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit
VLA	Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, England
WB	Western-Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Prionen (**proteinaceous infectious particles**; PRUSINER, 1982) gelten als neuartige „Erreger“ der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Diese können sporadisch, genetisch, iatrogen oder infektiös-bedingt auftreten. Zu ihnen gehören unter anderem Scrapie bei Schaf und Ziege, BSE beim Rind sowie die Variante der Creutzfeld-Jacob Krankheit (vCJD) beim Menschen.

Einen ätiologischen Zusammenhang zwischen BSE und vCJD vermutete man zunächst nur aufgrund örtlicher und zeitlicher Nähe des Auftretens dieser beiden relativ „jungen“ Prionen-Erkrankungen. Doch bald zeigten molekularbiologische und tierexperimentelle Daten die molekulare und pathogenetische Ähnlichkeit des infektiösen Agens. Insbesondere die Übertragbarkeit von BSE auf Makaken zeigte zu vCJD identische pathologische Merkmale (LASMÉZAS et al., 1996) und wies auf einen ursächlichen Zusammenhang hin. Als Expositionsquelle für das Auftreten der vCJD wird der Verzehr von Rindfleisch, das von BSE-Tieren gewonnen wurde, vermutet (ALMOND & PATTISON, 1997).

Im Hinblick auf Verbraucherschutz-Aspekte ist die Übertragbarkeit von bestimmten Formen der TSE auf den Menschen nicht nur von wissenschaftlichem, sondern auch von wirtschaftlichem und politischem Interesse. Eine systematische Untersuchung von Lebensmitteln der in Verdacht stehenden Spezies ist somit zwingend erforderlich.

Die Expression der zellulären Form des Prion-Proteins (PrP^{C}) ist die Grundvoraussetzung für eine Umformung in die pathogene Form (PrP^{Sc}). Diese Schlussfolgerung konnte daraus gezogen werden, dass PrP^{C} -Knockout-Mäuse sich resistent gegenüber Scrapie erwiesen (BÜELER et al., 1993). Insofern ist die Verteilung und Menge von PrP^{C} im Körpergewebe und in den Körperflüssigkeiten von pathogenetischer Bedeutung. Zudem ist die physiologische Funktion von PrP^{C} nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. PrP^{C} konnte in großer Menge im ZNS gefunden werden. Allerdings kommt es in weitaus geringeren Mengen auch in verschiedenen nicht-neuronalen Geweben wie Milz, Lymphknoten und Lunge beim Schaf (HORIUCHI et al., 1995) vor, ebenso in der ovinen Milchdrüse (MOUDJOU et al., 2001). Von der European Food Safety Agency (EFSA, 2004) zählen Milch, Kolostrum und Eutergewebe von Hauswiederkäuern zur Kategorie „keine Infektiosität nachweisbar“. Jedoch gibt es Daten aus neueren Studien, die darauf hinweisen, dass Infektiosität in Milch von kleinen Wiederkäuern nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einem, tierartlich vergleichend das Vorkommen von PrP^c in Eutergewebe und Milch von Rind, Schaf und Ziege zu untersuchen. Dies erfolgte mittels EIA, Western-Blot und Immunhistochemie. Zum anderen wurde Probenmaterial TSE-infizierter Tiere untersucht. Dabei wurden erstens die Vollmilch- und Kolostralproben künstlich mit Scrapie bzw. BSE infizierter Schafe mittels Western-Blot und EIA auf das Vorkommen von PrP^{res} hin getestet. Zweitens wurden von natürlich erkrankten BSE-Kühen aus Großbritannien Magermilch (mittels EIA und Western-Blot) sowie Eutergewebe (EIA, Western-Blot und Immunhistochemie) auf Vorhandensein von PrP^{res} untersucht.

Diese Arbeit wurde durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz im Rahmen des Forschungsverbundes *forprion* (Projekt LMU 19a) gefördert.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Prionen

2.1.1 Terminologie, Struktur und Eigenschaften der Prionen

In der gängigen Literatur werden zur Definition der verschiedenen Zustandsformen des Prion Protein im Wesentlichen drei Abkürzungen verwendet. PrP^{C} steht für die physiologisch vorkommende, zelluläre (C = cellular) Form des obengenannten Proteins. PrP^{Sc} bezeichnet seine pathologische Konformationsvariante (Sc = Scrapie), die mit dem Vorkommen von Infektiosität vergesellschaftet ist. Des Weiteren findet sich häufig die Bezeichnung PrP^{res} . (res = resistant). Diese Definition beschreibt ein biochemisch verändertes Verhalten des Proteins gegenüber dem Einfluss von Proteinase-K (PK), lässt jedoch offen, ob dieses veränderte Verhalten auch mit Infektiosität vergesellschaftet ist.

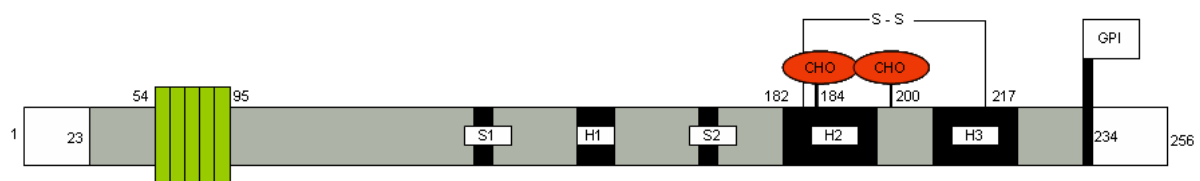
Für eine Übertragung von TSE ist nach dem heutigen Kenntnisstand das in seiner Struktur veränderte körpereigene Prion Protein verantwortlich. (PRUSINER, 1982; PRUSINER, 1991). PrP^{Sc} entsteht durch eine autokatalytische Umformung aus PrP^{C} . Letztgenanntes wird von einem single copy Gen (*prnp*; OESCH et al., 1985; BASLER et al., 1986) kodiert und ist das Translationsprodukt eines einzigen offenen Leserahmens (SCHÄTZL et al., 1995). Bei PrP^{C} handelt es sich um ein Sialoglykoprotein (ENDO et al., 1989; HARAGUCHI et al., 1989; RUDD et al., 1999), das mittels eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Ankers (GPI-Anker; STAHL et al., 1987) mit der Zellmembran verbunden ist und in cholesterinreichen, detergentunlöslichen Domänen an der Zelloberfläche (lipid rafts; TARABOULUS et al., 1995; VEY et al., 1996) gebunden vorliegt. Je nach Spezies ist die Gesamtlänge des Proteins leicht unterschiedlich (253 Aminosäuren beim Menschen (KRETZSCHMAR et al., 1986), 254 Aminosäuren bei der Maus (OESCH et al., 1985), 256 Aminosäuren beim Schaf (GOLDMANN et al., 1990)). Beim Rind kommt das PrP^{C} je nach Allel mit 5-7 Oktarepeat-Sequenzen vor (CASALONE et al., 2004) und besteht bei sechs Oktarepeats (Sequenz Pro-His/Gln-Gly-Gly-Gly-[Gly]-Trp-Gly-Gln; LÓPEZ GARCÍA et al., 2000) aus 264 Aminosäuren (HILLS et al., 2001). Im Säuger liegt die Homologie in der Aminosäuresequenz bei mehr als 90% (GROSCHUP et al., 1997).

Trotz der identischen Aminosäuresequenzen von PrP^{C} und PrP^{Sc} (STAHL et al., 1993), unterscheiden sich die Konformationsvarianten in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur sowie in ihren biochemischen Merkmalen deutlich. Diese sind zusammenfassend in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Biochemische Eigenschaften der Prion-Proteine

Eigenschaft	PrP ^c	PrP ^{Sc}	3 Referenz
Hydrophobizität	gering	deutlich	PRUSINER et al., 1981
Löslichkeit in milden Detergentien	löslich	unlöslich	MEYER et al., 1986; PRUSINER 1997
Proteinase K – Empfindlichkeit	sensitiv	partiell resistent	OESCH et al., 1985
Tendenz zur Aggregatbildung	nein	ja	PRUSINER et al., 1983

Mittels FTIR (Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie) konnten PAN et al. (1993) einen deutlichen Unterschied in der Sekundärstruktur ausmachen. Während PrP^c einen hohen alpha-Helix-Gehalt (42%) besitzt und nahezu keinen (3%) beta-Faltblatt-Anteil aufweist, zeigt PrP^{Sc} einen beta-Faltblatt-Anteil von 43% und nur 30% alpha-Helix-Struktur. Das „mature“ PrP^c, darstellbar mittels NMR (nuclear magnetic resonance), weist C-terminal eine globuläre Domäne auf (RIEK et al., 1997; ZAHN et al., 2000; LÓPEZ GARCÍA et al., 2000; LYSEK et al., 2005; Abb.1). Innerhalb der globulären Domäne befindet sich die einzige Disulfidbrücke des Proteins, die die Helices 2 und 3 verbindet. Die Disulfidbrücke (TURK et al., 1988) sowie die beiden Glykosylierungsstellen (ENDO et al., 1989) liegen auch bei PrP^{Sc} vor. Die N-terminale Hälfte ist unstrukturiert, beweglich und beinhaltet eine histidinreiche Oktarepeatsequenz, der kupferbindende Eigenschaften (BROWN et al., 1997) zugeschrieben werden.

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des ovinen PrP^c

In Anlehnung an die Abbildung von LIEMANN & GLOCKSHUBER (1998); Positionsbezeichnungen der ovinen Sequenz (nach HARMEYER et. al., 1998; MADDISON et al., 2007)

grau unterlegt: matures PrP^c; Sekundärstrukturelemente: H1-H3: alpha-Helices; S1+ S2: β -Faltblattstrukturen; CHO: Glykosylierungsstellen; S-S: Disulfidbrücke; grün: Oktarepeats (Schaf und Ziege: 5; Rind: 5-7)

Für PrP^{Sc} gibt es nur Modellvorstellungen (Abb. 2), da es aufgrund seiner Unlöslichkeit und seinem oligomeren Vorkommen (GLOCKSHUBER, 2001) nicht mit den derzeit zur Verfügung stehenden Strukturbestimmungsverfahren darstellbar ist. Allerdings weiß man seit langem, dass es in sog. Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF) „gestapelt“ vorkommt (MERZ et al., 1981; PRUSINER et al., 1983). Neuerdings vermutet man, dass Trimere aus PrP^{Sc}-Molekülen sich zu einer Fibrille zusammenfügen (GOVAERTS et al., 2004, LANGEDIJK et al., 2006).

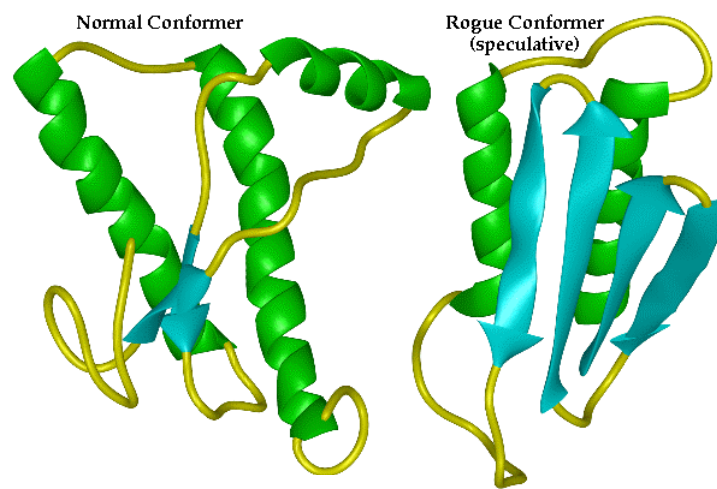


Abbildung 2: Modellvorstellung von PrP^C (links) und PrP^{Sc} (rechts). Entnommen aus <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/research/prions>

Die in Tabelle 1 erwähnte partielle Proteinase-K Resistenz wird in der Diagnostik als entscheidender Marker für den Nachweis von PrP^{Sc} verwendet (McKINGLEY et al., 1983; BEEKES et al., 1996) und synonym mit diesem benutzt. Da die im Teil „Material und Methoden“ dieser Arbeit beschriebenen Verfahren sich ebenfalls dieser biochemischen Eigenschaft bedienen, soll sie an dieser Stelle am Beispiel des Western-Blots näher erläutert werden. Bei dieser Methode zeigt PrP^C im unverdauten Zustand ein typisches auf seine drei unterschiedlichen Glykosylierungsformen (zweifach-, einfach- und unglykosyliert; COLLINGE et al., 1996; RIESNER, 2003) beruhendes Bandenmuster, welches bei einem Molekulargewicht zwischen 33-35 kDa liegt. Unter dem Einfluss von PK wird das Protein vollständig abgebaut. Auch PrP^{Sc} zeigt im unverdauten Zustand ein Molekulargewicht von 33-35 kDa. Durch Abspaltung eines aminoterminalen Peptids bestehend aus ca. 70 Aminosäuren wird es zu einem Molekül mit 27-30 kDa Molekülmasse (PrP²⁷⁻³⁰) reduziert (OESCH et al., 1985). Bei längerer Inkubationszeit der PK wird jedoch auch dieses vollständig degradiert (KUCZIUS & GROSCHUP, 1999).

Die PK-Resistenz wird als biochemischer Marker für PrP^{Sc} genutzt, allerdings korrelieren Infektiosität und PK-Resistenz nicht in allen Fällen (LASMÉZAS et al., 1997; RIESNER, 2003). Insofern steht PrP^{Sc} in dieser Arbeit für die infektiöse Form, PrP^{res} hingegen lediglich für die wichtige biochemische Eigenschaft. Als einziger Nachweis für Infektiosität gilt nach wie vor der Bioassay im Versuchstier (BEEKES & McPRIDE, 2007).

Durch die unterschiedliche Intensität der einzelnen, verschieden glykosylierten Formen („Glykosylierungsmuster“) kann man auch zwischen den verschiedenen Prionen-Erkrankungen unterscheiden („molecular strain typing“). So ist bei BSE die zweifach glykosylierte Form vorherrschend im Western-Blot, ebenso bei vCJD. Bei sporadischer oder iatrogener CJD hingegen ist die zweifach glykosylierte Form schwach ausgeprägt, während die einfach-glykosylierte oder die unglykosylierte Form die dominante Bande darstellt. Die biochemische Ähnlichkeit zwischen vCJD und BSE im Unterschied zu herkömmlichen CJD (COLLINGE et al., 1996) ist ein Hinweis auf den möglichen kausalen Zusammenhang der beiden Erkrankungen.

2.2 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien sind neurodegenerative Erkrankungen, die bei verschiedenen Säugerspezies vorkommen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über Prionen-Erkrankungen bei Mensch und Tier nach PRUSINER (1998)

Krankheit	Abkürzung	Wirt	Ätiologie
sporadische Creutzfeld-Jakob-Krankheit	sCJD	Mensch	somatische Mutation oder spontane Umwandlung von PrP ^c zu PrP ^{Sc}
familiäre Creutzfeld-Jakob-Krankheit	fCJD	Mensch	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
iatrogene Creutzfeld-Jakob-Krankheit	iCJD	Mensch	Infektion durch kontaminierte Wachstumshormonpräparate, Dura mater- und Hornhauttransplantate sowie neurochirurgisches Operationsbesteck
neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit	vCJD	Mensch	Infektion durch bovine Prionen?
Kuru	Kuru	Mensch	Infektion durch rituellen Kannibalismus
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom	GSS	Mensch	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
Fatal Familial Insomnia	FFI	Mensch	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
Scrapie (Traberkrankheit)	Scrapie	Schaf, Ziege	Infektion von genetisch empfänglichen Schafen
Bovine Spongiforme Enzephalopathie	BSE	Rind, Schaf, Ziege	Infektion mit Prionen-kontaminiertem Tiermehl
Transmissible Mink Enzephalopathie	TME	Nerz	Infektion mit Prionen-kontaminiertem Tiermehl
Feline Spongiforme Enzephalopathie	FSE	Katze	Infektion mit Prionen-kontaminiertem Tiermehl
Chronic Wasting Disease	CWD	Hirschartige	unbekannt

TSE sind geprägt durch eine jahrelange symptomlose Inkubationszeit. Je nach Ort der vorherrschenden Hirnveränderungen äußern sie sich durch unterschiedliche neurologische Ausfallserscheinungen. Sie enden stets tödlich (PRUSINER, 1998).

In der histopathologischen Untersuchung des Gehirns zeigen sich drei charakteristische Hauptmerkmale: Spongiforme Vakuolisierung, Neuronenuntergang und astrozytäre

Proliferation. Die spongiformen Veränderungen gaben den Erkrankungen ihren Namen. Ferner kommt bei einigen Fällen bzw. Krankheiten auch die Ablagerung amyloider Plaques hinzu (COLLINGE, 1997). Sie bestehen hauptsächlich aus PrP^{Sc}. PrP^{Sc} liegt in den Gehirnen TSE-erkrankter Individuen auch als amorphe Aggregate vor, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär (TARABOULUS et al., 1992) gelegen oder kann zu Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF; MERZ et al., 1981) aggregieren. Außer einer Mikroglia- und Makrophagenaktivierung sind nahezu keine immunologischen Reaktionen erkennbar (BERG, 1994; PERRY et al., 2002; KRETZSCHMAR, 2002).

2.2.1 Scrapie

Scrapie, die Traberkrankheit der Schafe, ist seit dem 18. Jahrhundert (DETWILER, 2001) bekannt. Ihre Übertragbarkeit wurde bereits 1936/1938 belegt (CUILLÉ & CHELLE). Eine genetisch bedingte Empfänglichkeit gegenüber Scrapie wurde mehrfach beschrieben (BELT et al., 1995; HUNTER et al., 1996; O'DOHERTY et al., 2002). Sie hängt demnach von Polymorphismen in den Codons 136, 154 und 171 des PrP-Gens ab (HUNTER et al., 1997; DAWSON et al., 1998; DRÖGEMÜLLER et al., 2003). Scrapie befällt natürlicherweise auch Ziegen (WOOD et al., 1992). Hinweise für eine Übertragung auf den Menschen gibt es keine (PRUSINER, 1982).

Die Verteilung des PrP^{Sc} bzw. seine Ausbreitung im Körper ist bei Scrapie eine andere als bei BSE beim Rind, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben wird. Es wird maternale Transmission (siehe Kapitel 2.3.5) vermutet, aber auch Hinweise für eine Verbreitung innerhalb der Herde durch orale Aufnahme infektiöser Eihäute oder über Hautwunden sind gegeben (DETWILER, 2001; GROSCHUP et al., 2001).

2.2.2 BSE

Die Krankheit wurde 1985 zum ersten Mal bei Rindern beschrieben (WELLS et al., 1987). Die Ursache für BSE wird in der Verfütterung von Scrapie-kontaminiertem Tiermehl an Rinder gesehen (Mischfutterhypothese; WILESMITH et al., 1988; DAHMS et al., 2001). Die Inkubationszeit beträgt knapp zwei bis über zehn Jahre (im Durchschnitt 4,5 Jahre), so dass die Erkrankung nur bei erwachsenen Tieren auftritt (HÖRNLIMANN & INFANGER, 2001). Sie äußert sich sowohl durch Verhaltensänderungen, Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen als auch durch unspezifische Symptome wie reduzierte Milchleistung

und Abmagern bei zunächst erhaltener Fresslust (WILESMITH et al., 1988; BRAUN et al., 1998a). Im Gegensatz zu Scrapie-infizierten Schafen ist starker Juckreiz kein vorherrschendes Symptom bei Rindern mit BSE (WILESMITH et al., 1988). Beim kleinen Wiederkäuer hingegen ist BSE klinisch von Scrapie nicht zu unterscheiden (FOSTER et al., 2001; HOUSTON & GRAVENOR, 2003; THURING et al., 2005). Die Diagnose BSE ist nur post mortem mit Hilfe der histopathologischen, immunhistochemischen, elektronenmikroskopischen Untersuchung oder der Untersuchung mittels SAF-Immunoblot (OIE-Bestätigungsmethoden) zu stellen (GRETZSCHEL et al., 2005).

Die Hypothese, dass BSE und vCJD vom selben Erreger-Stamm verursacht werden, gilt heute als sehr wahrscheinlich (KRETZSCHMAR, 2002). Hierfür sprechen der in der Einleitung erwähnte Übertragungsversuch von BSE auf Makaken (LASMÉZAS et al., 1996) sowie Versuche an Inzuchtmäusen. Übertrug man BSE und vCJD auf sie, riefen sie nach derselben Inkubationszeit ein identisches pathologisches Bild hervor, während sich die sporadische CJD sowie alle untersuchten Scrapie-Stämme deutlich davon unterschieden (BRUCE et al., 1997). BRUCE et al. (1997) arbeiteten dabei auch mit Läsionsprofilen, einer semiquantitativen Methode, bei der der Vakuolisierungsgrad bestimmter Hirnareale erfasst wird (FRASER & DICKINSON, 1973). Zudem zeigten biochemische Methoden (COLLINGE et al., 1996; HILL et al., 1997) ein sehr ähnliches Bandenmuster im Western-Blot (s. Kapitel 2.1.1) sowie ein nahe beieinander liegendes Verhältnis von zweifach- zu einfach glykosylierter Form bei Messung der Bandenintensität. vCJD erschloss sich somit als „humane BSE“ (ALMOND & PATTISON, 1997). Auch zur Unterscheidung von BSE und Scrapie im Schaf können u. a. biochemische Methoden dienen (NONNO et al., 2003; GRETZSCHEL et al., 2005). Es wird das Verhältnis der Glykosylierungsformen (zweifach zu einfach glykosylierter Form) sowie die Größe der Bande des unglykosylierten PrP nach Verdau mit N-Glykosidase F (PNGase F) herangezogen.

Für BSE gibt es mittlerweile Hinweise für die Existenz einer sporadischen Form (CASALONE et al., 2004; CAPOBIANCO et al., 2007; BÉRINGUE et al., 2007).

2. 3 Vorkommen von Prion Protein

2.3.1 Vorkommen und Verteilung von PrP^C im Gesamtorganismus

Zunächst wurde in Neuronen des Hamsters die Expression von PrP-mRNA (KRETZSCHMAR, 1986) als auch von zellulärem Prion Protein (DeARMOND et al., 1987)

sowie die Expression von mRNA und Protein in Lymphozyten des Menschen (CASHMAN et al., 1990) nachgewiesen. Inzwischen konnte PrP^C in einer Vielzahl von neuronalen und nicht-neuronalen Gewebe beim Hamster nachgewiesen werden (BENDHEIM et al., 1992). Eine breitgefächerte Expression des Prion Proteins ist mittlerweile größtenteils auch für Wiederkäuer auf Proteinebene (HORIUCHI et al., 1995; MOUDJOU et al., 2001) als auch auf mRNA-Ebene (TICHOPAD et al., 2003) bestätigt worden. Die tierartlich vergleichende Darstellung zur mengenmäßigen Organverteilung von PrP^C bei Schaf und Rind beschrieb BOESEN (2005). Das Gehirn ist am PrP^C-reichsten; die anderen Organe enthalten demgegenüber 20 bis 50 mal weniger PrP^C (MOUDJOU et al., 2001).

2.3.2 Mögliche Funktionen des PrP^C

Aufgrund des Vorkommens von PrP^C in allen untersuchten Mammalia (HARMEYER et al., 1998) und der hohen Konservierung von Teilen des PrP^C auch über die Mammalia hinaus (WOPFNER et al., 1999; RIVERA-MILLA, 2006), kann man auf eine grundlegende physiologische Funktion des PrP^C schließen (WESTERGARD et al., 2007). Um diese herauszufinden, werden verschiedene Wege begangen. Eine Strategie besteht darin, *in vitro* Bindungspartner von PrP^C zu finden. Andere Forschergruppen versuchen, die physiologische Funktion des PrP^C über den Phänotyp PrP-loser Tiere herauszufinden, die durch Knock-out des prnp-Gens erzeugt wurden (prnp^{0/0}-Tiere). Eine weitere Möglichkeit liegt in der Beobachtung der zelltyp-spezifischen Expression des PrP^C sowie in dessen subzellulärer Lokalisation in den einzelnen Zelltypen.

BÜELER et al. (1992) schufen die ersten prnp^{0/0}-Mäuse und konnten weder in ihrer Entwicklung noch in ihrem Verhalten Auffälligkeiten entdecken. Bei weiteren Versuchen mit prnp^{0/0}-Mäusen ließen sich jedoch subtile phenotypische Veränderungen beobachten wie etwa in der Signalübertragung an den Synapsen (COLLINGE et al., 1994; MANSON et al., 1995; MALLUCCI et al., 2002), den Ionenflüssen (COLLINGE et al., 1996; HERMS et al., 2001), der Organisation der Nervenfasern (COLLING et al., 1997), im Schlaf-Wach-Rhythmus (TOBLER et al., 1996; TOBLER et al., 1997) sowie im räumlichen Lernen (CRIADO et al., 2005). Diese geringfügigen neurobiologischen Abnormalitäten könnten damit zusammenhängen, dass PrP^C Anteil an der Synapsenbildung und ihrer Funktion hat (WESTERGARD et al., 2007). Dafür spricht auch das Vorkommen von PrP^C vor allem entlang der Axone und in den präsynaptischen Endigungen (MOYA et al., 2000; LAINÈ et al., 2001; SALÈS et al., 2002; MIRONOV JR. et al., 2003).

Bei männlichen *prnp*-Knock-out-Rindern (RICHT et al., 2007) konnten bei einer Vielzahl von untersuchten Stoffwechselfparametern im Vergleich zu einer Kontrollgruppe keine auffälligen Unterschiede festgemacht werden. Da Prion-Protein-Knock-out-Tiere phänotypisch keine gravierenden Veränderungen zeigen, kann ein Funktionsverlust von PrP^c durch Prionen-Erkrankungen nicht allein die Ursache für deren Krankheitsbild sein (RICHT et al., 2007; WESTERGARD et al., 2007). Es werden aber ein Funktionsgewinn durch PrP^{Sc}, der toxische Auswirkungen hat, eine Kombination von Funktionsverlust und -gewinn sowie eine funktionsverändernde Wirkung als molekulare Grundlage für die Prionen-Erkrankungen diskutiert (TATZELT & SCHÄTZL 2007; WESTERGARD et al., 2007).

Bislang ist die kupferbindende Eigenschaft der Oktarepeat-Sequenzen (BROWN et al., 1997; STÖCKEL et al., 1998; VILES et al., 1999) und zwei weiterer Stellen des PrP^c (JONES et al., 2005) belegt. Sie wird für unterschiedliche Funktionen als physiologisch bedeutsam angesehen (WECHSELBERGER et al., 2002; VASSALLO & HERMS, 2003; MILLHAUSER, 2007). So soll PrP^c unter anderem als Rezeptor für die zelluläre Aufnahme und den Efflux von Kupferionen dienen (PAULY & HARRIS, 1998; BROWN, 2001). Hierfür spricht eine Korrelation zwischen Expressionslevel des PrP^c und dem Kupfergehalt der entsprechenden Zellen. So soll der Kupfergehalt in Hirngewebe von *prnp*^{0/0}-Mäusen nur 10 bzw. 50% dessen von Wildtypmäusen ausmachen (BROWN et al., 1997; HERMS et al., 1999), was von anderen Autoren (KRETZSCHMAR et al., 2000; WAGGONER et al., 2000) jedoch nicht nachvollzogen werden konnte und daher umstritten ist (WESTERGARD et al., 2007). Des weiteren wirkt Kupfer auf die Konformationsstabilität von PrP^c (WADSWORTH et al., 1999; WECHSELBERGER et al., 2002).

Seine membrangebundene Lage ließ vermuten, dass PrP^c als Verbindungsglied von Extrazellular- und Intrazellularraum in Signalketten dient (WECHSELBERGER et al., 2002). Hierfür sprechen verschiedene Bindungspartner wie der Vorläufer des Laminin-Rezeptors und p66. PrP^c könnte jedoch auch der Zelladhäsion dienen (WESTERGARD et al., 2007), die Bindung an NCAMs (neural cell adhesion molecules; SCHMITT-ULMS et al., 2001) ist ein Indiz hierfür.

Ein weiterer Bindungspartner von PrP^c ist BAX, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, das eine Rolle in postmitotischen Neuronen des ZNS spielt. Durch Hemmung der Bax-vermittelten Apoptose könnte PrP^c auf verschiedenen Signalwegen zytoprotektiv wirken (WESTERGARD et al., 2007). Dafür sprechen mehrere Versuche in Zellkultur, Hefen und *prnp*^{0/0}-Mäusen, in denen das zelluläre Prion Protein vor der apoptotischen Wirkung des BAX

schützen konnte (SHMERLING et al., 1998; KUWAHARA et al., 1999; ROUCOU & LeBLANC, 2005; LI & HARRIS, 2005).

Von BROWN et al. (1999) wurde sowohl bei rekombinantem als auch bei immunpräzipitiertem PrP^C der Maus eine der Superoxid-Dismutase ähnliche kupferabhängige Aktivität des PrP^C festgestellt. Sie soll die Zelle vor oxidativem Stress schützen. Dies wird kontrovers diskutiert (WECHSELBERGER et al., 2002; WESTERGARD et al., 2007). Jedoch gibt es andere Argumentationslinien, die für einen Schutz vor oxidativem Stress durch PrP^C sprechen. So könnte PrP^C die Zelle indirekt schützen, indem es die Aktivität von Enzymen, die freie Radikale detoxifizieren, erhöht. Auch kann oxidativer Stress die Apoptoserate erhöhen, was durch PrP^C verhindert wird (MILHAVET & LEHMANN, 2002). Belegt ist, dass kultivierte Neuronen von prnp^{0/0}-Mäusen anfälliger gegenüber Substanzen sind, die oxidativen Stress verursachen. Des Weiteren zeigen die Gehirne von prnp^{0/0}-Mäusen biochemische Veränderungen, die auf oxidativen Stress hinweisen (WESTERGARD et al., 2007).

2.3.3 Ausbreitung von PrP^{Sc} im infizierten Organismus

Die Ausbreitung des pathogenen PrP ist bei den verschiedenen TSE-Erkrankungen nicht identisch. Studien zu diesem Thema wurden vor allem mit experimentell infizierten Labornagern durchgeführt. Je nach Infektionsroute ergab sich eine unterschiedliche Beteiligung der verschiedenen Organe (BEEKES & McBRIDE, 2007). Im Folgenden soll jedoch nur auf den peroralen Infektionsweg eingegangen werden, da die in dieser Arbeit untersuchten Schafe peroral infiziert wurden und auch bei den BSE-Kühen (natürliche Infektion) von einer oralen Infektion ausgegangen werden muss.

Als hauptsächlicher Aufnahmeort bei oraler Infektion mit Scrapie oder BSE wird das kaudale Jejunum und das Ileum angesehen (BEEKES & McBRIDE, 2007). Im Mausmodell zeigte sich PrP^{res} über den gesamten Verdauungstrakt vom Magen bis zum Kolon hin (MAIGNIEN et al., 1999) nur bei Scrapie-Infektion, nicht jedoch bei BSE. In M-Zellen (microfold cells) wurde *in vitro* die Fähigkeit zur Transzytose von Scrapie-Prionen nachgewiesen (HEPPNER et al., 2001). *In vivo* wurde nach dem Überschreiten der Darmbarriere die Aufnahme von PrP^{res} durch Darmmakrophagen (MAIGNIEN et al., 2005) und für dendritische Zellen (DC) die Fähigkeit zur Aufnahme und zum Transport von PrP^{Sc} zu den Mesenteriallymphknoten (HUANG et al., 2002) belegt. Es erfolgt die Ansammlung in mobilen und stationären Zellen des darmschleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebes (gut-associated lymphatic tissue

(GALT); BEEKES & McBRIDE, 2007). Der erste Nachweisort von pathologischem PrP bei experimentellen Infektionen von Mäusen bzw. Hamstern mit Scrapie sind Peyersche Platten und Mesenteriallymphknoten sowie gleichzeitig enterische Neuronen (KIMBERLIN & WALKER, 1989; BEEKES & McBRIDE, 2000).

Nach der Aufnahme im Darm sammelt sich bei Scrapie das PrP^{Sc} in Teilen des lymphoretikulären Systems (LRS) an. Es folgt die Neuroinvasion ins periphere Nervensystem und der Aufstieg ins ZNS (KRETZSCHMAR et al., 2002; BEEKES & McBRIDE, 2007). So fanden sich im präklinischen Stadium bei Tieren aus natürlich Scrapie-infizierter Schafherden nur manchmal PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn und zwar grundsätzlich weniger als im Magen-Darm-Trakt (CAPLAZI et al., 2004). Dabei kam das PrP^{Sc} sowohl im Lymphgewebe innerhalb als auch außerhalb des Magen-Darm-Traktes vor. Bei BSE im Rind ist die Ausbreitung des PrP^{Sc} im LRS auf einen Teil der Tonsillen und des GALT beschränkt (AGUZZI et al., 2007; BEEKES & McBRIDE, 2007; ESPINOSA et al., 2007). In den Peyerschen Platten des distalen Ileums fand es sich zumeist bei experimenteller Infektion (WELLS et al., 1998; TERRY et al., 2003; BUSCHMANN & GROSCHUP, 2005; ESPINOSA et al., 2007) aber nur bei einem natürlichen BSE-Fall (BUSCHMANN & GROSCHUP, 2005). Mit einem Rinder-Bioassay konnte bislang in einem Fall in der Gaumenmandel eines oral infizierten Rindes in der präklinischen Phase (WELLS et al., 2005) Prion-Infektiosität nachgewiesen werden. Bei BSE im Schaf hingegen ist das LRS in großem Umfang betroffen (JEFFREY et al., 2001; FOSTER et al., 2001). So konnte PrP^{Sc} sowohl in Kopf- als auch in Körperlymphknoten sowie in der Milz nachgewiesen werden.

Für die Neuroinvasion finden sich in der Literatur für Scrapie verschiedene mögliche Wege. Zum einen vom enterischen Nervensystem (ENS) entlang der sympathischen Fasern der *Nervi splanchnici major et minor* über das *Ganglion coeliacum* und *Ganglion mesenterium craniale* ins thorakale Rückenmark. Zum anderen vom ENS entlang der parasympathischen Fasern des *Nervus vagus* über das *Ganglion nodosum* ins Stammhirn (VAN KEULEN et al., 1999; McBRIDE et al., 2001; BEEKES & McBRIDE, 2007). Vom Eintrittsort ins ZNS aus kann die weitere Ausbreitung von PrP^{Sc} sowohl in aufsteigende als auch in absteigende Richtung erfolgen (BEEKES & McBRIDE, 2007). Beim ersten Weg können vom thorakalen Rückenmark aus auch die Spinalganglien erreicht werden. Bei künstlich mit BSE infizierten Schafen konnte PrP^{Sc} im ENS, im *N. vagus*, seinem motorischen Kerngebiet sowie im *Ganglion coeliacum* und in den Spinalganglien (JEFFREY et al., 2001; FOSTER et al., 2001) nachgewiesen werden. Somit sind Teile von beiden für Scrapie diskutierten Wege auch bei BSE beim Schaf betroffen. Bei Fällen natürlicher BSE im Rind lässt sich PrP^{Sc} im *Plexus myentericus* des distalen Ileums, in den Spinalganglien und in den motorischen Wurzelzellen

des *N. vagus* in der *Medulla oblongata* (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000; IWATA et al., 2006) detektieren. Aus einer BSE-Studie mit oraler Infektion von Rindern (HOFFMANN et al., 2007) ließen sich viele Argumente für die oben genannten zwei Wege finden. Allerdings konnte kein PrP^{Sc} im ENS nachgewiesen werden. Des Weiteren schienen die Spinalganglien erst später betroffen zu sein. Bei der in dieser Studie verwendeten hohen Infektionsdosis wurde PrP^{Sc} bereits nach 24 Monaten im Stammhirn nachgewiesen.

Auf die Verteilung im ZNS soll hier nicht näher eingegangen werden. Sie unterscheidet sich innerhalb der Prionen-Erkrankungen und ist zudem ein Unterscheidungskriterium der verschiedenen Prionen-Stämme (AGUZZI et al., 2007). Die zentrifugale Ausbreitung vom ZNS über periphere Nerven wird als eine Erklärung vorgeschlagen, weshalb PrP^{Sc} seit neuestem auch an peripheren Orten des Körpers wie z. B. den Muskeln nachgewiesen wurde (BEEKES & McBRIDE, 2007). Hierfür spricht, dass bei zwei BSE-Kühen im präklinischen Stadium PrP^{Sc} in Femoral- und Lumbarnerven (IWATA et al., 2006) nachgewiesen wurde. Ob das PrP^{Sc} im Kniefaltenlymphknoten eines BSE-Schafes von der Verbreitung über die Innervation oder aber einer hämatogenen Ausbreitung (siehe unten) herrührt, bleibt offen (FOSTER et al., 2001).

Im Muskelgewebe konnte PrP^{Sc} bei oral infizierten Hamstern nachgewiesen werden (THOMZIG et al., 2003). ANDRÉOLETTI et al. (2004) fanden pathogenes PrP (Immunhistochemie und Western-Blot) in der inneren Lenden-, Vorder- und Hintergliedmaßenmuskulatur von experimentell oder natürlich mit Scrapie infizierten Schafen. Die Ablagerungen des PrP^{res} fanden sich hierbei an den Muskelspindeln. In der Muskulatur von Kühen mit BSE konnte in der Regel kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden (BUSCHMANN & GROSCHUP, 2005; ESPINOSA et al., 2007).

Die beschriebenen Phasen der Aufnahme im Darm, Ansammlung im LRS, Neuroinvasion, Aufstieg zum und Verteilung im ZNS und zentrifugale Ausbreitung vom ZNS zu weiteren peripheren Körperstellen sind bei den verschiedenen TSE-Erkrankungen zu beobachten. Sie können sich teilweise auch überschneiden (KRETZSCHMAR, 2002; BEEKES & McBRIDE, 2007). Alternativ wurde eine direkte Neuroinvasionsroute vom enterischen Nervensystem ins ZNS bei Scrapie und BSE im Schaf beschrieben, die Ausbreitung im LRS entfällt hierbei (KIMBERLIN & WALKER, 1989; VAN KEULEN et al., 1999; BEEKES & McBRIDE, 2000, JEFFREY et al., 2001). Dass eine Phase im LRS für die Neuroinvasion nicht notwendig ist, zeigten auch CROZET et al. (2007) bei intraperitonealer Infektion von transgenen Mäusen, die ovines Prion Protein nur in Neuronen exprimierten.

Die Ausbreitung über Blut und Lymphe wird nach wie vor kontrovers diskutiert. BEEKES & McBRIDE (2007) zufolge ist sie bei verschiedenen TSE für die Infektion des Gehirns kein relevanter Weg. Es gibt allerdings den Nachweis für hämatogene Übertragung bei Blut-Transfusionen von natürlich Scrapie-infizierten oder peroral mit BSE infizierten Schafe in Schafe aus TSE-freien Herden (HOUSTON et al., 2000; HUNTER et al., 2002). Außerdem gibt es bei mehreren vCJD-Patienten (LLEWELYN et al., 2004; PEDEN et al., 2004) Hinweise für eine iatrogene Übertragung mittels Blut. Beim Weg vom ZNS in periphere Körperregionen wird die hämatogene Übertragung von einigen Autoren in Betracht gezogen (FOSTER et al., 2001; BEEKES & McBRIDE, 2007).

2.3.4 Anatomie und Physiologie der Milchdrüse und Nachweis von PrP^C in Milch

In Hinblick auf die Expression von PrP^C soll im Folgenden vor allem auf histologische und zytologische Aspekte des Drüsenparenchyms und wegen einer potentiellen Konversion in PrP^{Sc} auf die Versorgung des Euters mit Blut, sein Lymphsystem sowie seine Innervation eingegangen werden.

Das Hohlraumsystem der Drüse wird durch den Strichkanal, die Milchzisterne (*Sinus lactifer*), die Milchgänge (*Ductus lactiferi*) und proximal den Drüsenendstücken (*Alveoli glandulae mammariae*) gebildet. Die Milchgänge besitzen ein zweischichtiges Epithel (MICHEL, 1979; MICHEL & SCHULZ, 1987). Es besteht aus einer basalen Schicht kleiner, polymorpher Zellen und eine apikalen Schicht iso- bis hochprismatischer Zellen. Die proximalen Wandepithelien sind noch zur Sekretion befähigt (LIEBICH, 2004). Sämtliche Milchgänge sind außen von einer Schicht myoepithelialer Zellen umgeben, die der Milchejektion dienen (MAYER & KLEIN, 1961, LIEBICH, 2004). Die den Milchgängen proximal folgenden Drüsenendstücke (Alveolen) sind verzweigt und zum Teil hintereinander geschaltet. Ihr einschichtiges Epithel wird von den kubischen bis säulenförmigen Laktozyten, den milchproduzierenden Zellen, gebildet (NICKERSON, 1994). Die Laktozyten werden von kontraktile Korbzellen, den Myoepithelzellen, die die Funktion glatter Muskelzellen erfüllen (LIEBICH, 2004), umspannt. Sie sind von einer dünnen Basalmembran, kollagenen und elastischen Fasern, einem dichten Netz aus arteriellen und venösen Blutkapillaren, die den intensiven Stoffaustausch ermöglichen, und von Nerven umgeben (ZIEGLER & MOSIMANN, 1960; SCHAMS, 1983). Je nach Füllung der Alveolen ist das Epithel eher flach bei Druck durch starke Milchfüllung oder nimmt iso- bis hochprismatische Form während der Milchsynthese und -sekretion an (MAYER & KLEIN, 1961; NICKERSON, 1994).

Sensibel innerviert sind vor allem die Haut der Zitzen und Gefäßwände (GROSVENOR & MENA, 1974). Die vegetative Innervation erfolgt über sympathische Fasern und versorgt Korbzellen, glatte Muskelfasern und Gefäße. Die Drüsenzellen selbst hingegen sind nicht sympathisch innerviert, eine Darstellung der parasympathischen Innervation der Milchdrüse war bislang nicht möglich (HABERMEHL, 2005).

Die Lymphe aus der Milchdrüse wird den regionären Lymphknoten zugeleitet. Dies sind bei den Wiederkäuern die *Lymphonodi (Lnn.) inguinalis superficiales seu mammarii* (HABERMEHL, 2005). Beim Schaf soll die Lymphe aus dem Euter auch direkt den *Lnn. iliofemorales* und den *Lnn. iliaki mediales* zufließen (BRAGULLA & KÖNIG, 2005).

Die Milchsynthese wird nur durch den hohen Blutdurchfluss des Euters von bis zu 600 Liter Blut zur Produktion von einem Liter Milch (BRAGULLA & KÖNIG, 2005) möglich. In ihrer Feinstruktur zeigen Laktozyten alle Merkmale stoffwechsel- und sekretionsaktiver Zellen. Dazu gehört ein deutlich ausgeprägter Golgi-Apparat sowie ein ebenso stark raumeinnehmendes endoplasmatisches Retikulum (LIEBICH, 2004). An diesen Zellorganellen laufen die wichtigen Stoffwechselprozesse zur Bildung einiger Milchinhaltsstoffe ab. Diese werden zum einen mittels merokriner Sekretion (Exozytose; bei Kaseinen) ins Drüsenlumen abgegeben (HOLLMANN, 1974; LIEBICH, 2004) oder aber durch einen apokrinen Sekretionsmechanismus (Milchfett) ins Alveolarlumen freigesetzt (LIEBICH, 2004; HABERMEHL, 2005). Andere Bestandteile der Milch, vor allem die Elektrolyte gelangen über das Kapillarnetz an die Drüsenepithelien und werden transepithelial an die Milch abgegeben (LIEBICH, 2004).

Bis zu einer Woche *post partum* wird die Milch als Kolostrum (Biestmilch) bezeichnet. Kolostrum ist besonders reich an Fett und Immunglobulinen. Zum Teil können Erythrozyten im Kolostrum vorhanden sein und ihm eine rötliche Farbe verleihen (BRAGULLA & KÖNIG, 2005). Die Immunglobuline werden von Plasmazellen im Blut oder im interstitiellen Bindegewebe gebildet und transepithelial an die Milch abgegeben (LIEBICH, 2004).

Die somatischen Zellen der Milch setzen sich aus verschiedenen Zellpopulationen zusammen. Je nach Gesundheitsstatus, Laktationsstadium und Laktationsnummer finden sich Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Epithelzellen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen (PAAPE et al., 1979; LEE et al., 1980; PAAPE et al., 1981; KURZHALS et al., 1985; WEVER & EMANUELSON, 1989; MILLER et al., 1991; LABOHM et al., 1998; SCHROEDER, 2003).

PrP^C konnte im Eutergewebe von Schafen (HORIUCHI et al., 1995; MOUDJOU et al., 2001) und mittlerweile auch von Rindern (DIDIER et al., 2006) nachgewiesen werden. Auch in Milch selbst wurde PrP^C detektiert und zwar bei Schaf, Ziege, Rind und Mensch (BOESEN, 2005; FRANSCINI et al., 2006; MADDISON et al., 2007).

2.3.5 Bisherigere Untersuchungen zur Übertragbarkeit von TSE durch Milch bzw. Eutergewebe

Zur Übertragbarkeit von Prionen-Erkrankungen via Milch und Eutergewebe gab und gibt es zahlreiche Studien, die epidemiologischer sowie direkt experimenteller Natur sind. Hinzu kommen verschiedene Ansätze PrP^{Sc} im Euter bzw. der Milch deskriptiv nachzuweisen, ohne dabei Bioassays durchzuführen.

Die älteren epidemiologischen Studien gehen auf WILESMITH & RYAN (1997a) zurück. Aufgrund dessen wird das Risiko der maternalen Übertragung auf ca. 10% geschätzt (TYSHENKO, 2007). Der Begriff der maternalen Übertragung wird häufig im angelsächsischen Raum verwendet und umfasst prä-, peri- und postnatale Erregerübertragung vom Muttertier auf die Nachkommen (GROSCHUP et al., 2001). Es werden durch diesen Begriff somit horizontale und vertikale Übertragungswege im Rahmen der Fortpflanzung und Geburt umfasst. Andere epidemiologische Studien ergaben keine Hinweise für eine maternale Übertragung (WILESMITH & RYAN, 1997b; BRAUN et al., 1998b; FATZER et al., 1998) und Milch erscheint als Infektionsquelle daher unwahrscheinlich (WILESMITH & RYAN, 1997b). Ebenso wurde für die humanen TSE wie vCJD und Kuru ermittelt, dass Babys, die von ihren TSE-kranken Müttern gestillt wurden, nicht erkrankten (RIDLEY, 1995; BAKER & RIDLEY, 1996; GROSCHUP et al., 2001; VETRUGNO, 2004). Dies spricht gegen Milch und Kolostrum als Infektionsquelle.

Tierexperimentelle Daten ergaben bislang ebenfalls, dass Milch kein geeignetes Übertragungsmedium darstellt. So konnten HADLOW et al. (1982) bei intracerebraler Injektion von Eutergewebe und Kolostrum von Scrapie-infizierten Schafen in Mäuse keine Infektiosität nachweisen. Der Bericht über eine Frau mit sCJD, deren Kolostrum Mäuse durch intracerebrale Übertragung infiziert haben soll (TAMAI et al., 1992), konnte nicht bestätigt werden und gilt als nicht relevant (TYSHENKO, 2007). Für BSE wurden ebenfalls verschiedene Maus-Bioassays durchgeführt. Durch die Verfütterung von „Milchdrüse plus Milch“ oder supramammäre Lymphknoten (MIDDLETON & BARLOW, 1993) von BSE-Kühen an Mäuse konnte die Krankheit nicht übertragen werden. TAYLOR et al. (1995)

verabreichten verschiedenen Mäusegruppen Milch von BSE-Kühen oral, intracerebral oder intraperitoneal. Keine der Mäuse zeigte neurologische Symptome oder eine spongiforme Enzephalopathie. Bioassays in der Maus sprechen somit gegen eine Infektiosität von Milch. Allerdings ist aufgrund der Speziesbarriere zwischen Rind und Maus (WELLS et al., 1998; TYSHENKO, 2007) weiterhin nicht völlig auszuschließen, dass durch Milch Prionen übertragen werden. Allerdings konnten CASTILLA et al. (2005) in transgenen Mäusen, die bovines Prion Protein exprimierten (boTg-Mäuse) und denen Milch infizierter Muttertiere intracerebral injiziert wurde, kein PrP^{res} nachweisen.

Bei den rein deskriptiv orientierten Studien zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. In einer Studie mit immunhistochemischer Methode konnte PrP^{Sc} im Drüsenparenchym des Euters von Scrapie-Schafen nicht nachgewiesen werden, allerdings regelmäßig im Euterlymphknoten (CAPLAZI et al., 2004). LIGIOS et al. (2005) dagegen propagieren das Vorkommen von Scrapie Prionen in lymphoiden Strukturen des Euters bei gleichzeitig an Scrapie und Mastitis erkrankten Schafen. Kein pathogenes Prion Protein konnte in den somatischen Zellen von Milch und Kolostrum BSE-infizierter Kühe nachgewiesen werden (EVEREST et al., 2006).

2.4 Nachweismöglichkeiten für PrP

2.4.1 Immunchemische Tests in der Diagnostik

Mittlerweile gibt es sowohl für die TSE-Überwachung beim Rind (Tab. 3) als auch bei den kleinen Wiederkäuern (Tab. 4) mehrere Schnelltests. Die Evaluierung und Zulassung bezieht sich immer auf Probenmaterial aus der Obex-Region. Bei den meisten Tests handelt es sich dabei um EIAs, es ist allerdings auch jeweils ein Western-Blot für die Durchführung von Schnelltest (gemäß Artikel 5 Absatz 3 und Artikel 6 Absatz 1 der Verordnung (EG) Nr. 999/2001) zugelassen. Reagiert eine Probe im Screening-Verfahren positiv, erfolgt die Abklärung anhand der OIE-Bestätigungsmethoden (siehe Kapitel 2.2.2).

Tabelle 3: Übersicht über die derzeit in der Europäischen Union zugelassenen Schnelltests zur BSE-Überwachung bei Rindern (nach VO (EG) Nr. 253/2006 der Kommission vom 14. Februar 2006; Zusatzinformationen nach GRUNDMANN & LÜCKER, 2006)

Typ	Bezeichnung	Hersteller (Vertrieb)	Ort	Zulas- sung
WB	Prionics-Check WESTERN®	Prionics A.G.	Schweiz	1999*
IA	Prionics-Check PrioSTRIP®	Prionics A.G.	Schweiz	2004*
EIA	Enfer TSE Assay®	Enfer Scientific Ltd (Abbott Diagnostics)	Irland	1999
	Roche Applied Science PrionScreen®	Roche Diagnostics GmbH (R-Biopharm)	Deutsch- land	1999*
	Prionics-Check LIA-®	Prionics A.G.	Schweiz	2002*
	Beckman Coulter InPro CDI kit® (konformationsabhängiger Immunoassay)	InPro Biotechnology	USA	2002
	Institut Pourquier Speed'it BSE®	Institut Pourquier	Frank- reich	2004
	Enfer TSE Kit version 2.0® (automatisierte Probenvorbereitung)	Enfer Scientific Ltd (Abbott Diagnostics)	Irland	2004*
	CediTest BSE Test®	CEDI Diagnostics	Nieder- lande	2004
	IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit®, EIA	IDEXX Laboratories Inc.	USA	2004*
	Bio-Rad TeSeE®-Test (Sandwich-Immunoassay)	Commissariat á l'Énergie Atomique (BioRad)	Frank- reich	2004*
	Roboscreen Beta Prion BSE EIA® Test Kit	AJ Roboscreen GmbH	Deutsch- land	2004*
	Fujirebio FRELISA BSE post mortem rapid BSE Test®	Fujirebio	Japan	2005

WB = Western-Blot

IA = Immunchromatographischer Assay (Seitenstrom-Immunoassay)

EIA = Enzymimmuno-Assay

* = darf in Deutschland eingesetzt werden (FLI, 2007)

Tabelle 4: Übersicht über die derzeit in der Europäischen Union zugelassenen Schnelltests zur TSE-Überwachung bei Schafen und Ziegen (nach VO (EG) Nr. 253/2006 der Kommission vom 14. Februar 2006)

Typ	Bezeichnung	Hersteller (Vertrieb)	Ort	Zulas- -sung
WB	Prionics-Check WESTERN SR®	Prionics A.G.	Schweiz	2005
EIA	Beckman Coulter InPro CDI kit® (konformationsabhängiger Immunoassay)	InPro Biotechnology	USA	2005
	Enfer TSE Kit version 2.0® (automatisierte Probenvorbereitung)	Enfer Scientific Ltd (Abbott Diagnostics)	Irland	2005
	POURQUIER'S-LIA Scrapie®	Institut Pourquier	Frank- reich	2006
	IDEXX HerdChek BSE-Scrapie- Antigen-Testkit®, EIA	IDEXX Laboratories Inc.	USA	2006*
	Bio-Rad TeSeE®-Test (Sandwich-Immunoassay)	Commissariat à l'Énergie Atomique (BioRad)		2005
	Prionics-Check LIA Small Ruminants®	Prionics A.G.	Schweiz	2005

WB = Western-Blot

EIA = Enzymimmuno-Assay

* = darf in Deutschland eingesetzt werden (FLI, 2007)

Da EIAs zumeist das Kriterium der Schnelligkeit (in der Regel innerhalb von vier bis acht Stunden durchführbar) besser erfüllen, wird ihnen im Screening-Bereich der Vorrang eingeräumt. Für weitergehende Interpretationen hingegen eignen sich oftmals Western-Blots besser, da sie weitere Aussagemöglichkeiten (s. 2.1.1) bieten, z. B. über die Bandenintensität der verschiedenen Glykoformen.

2.4.2 Histopathologie und Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Untersuchung wird PrP^C bzw. PrP^{Sc} in Gewebeschnitten durch eine Immunreaktion mit Antikörpern nachgewiesen. Ob pathogenes oder zelluläres Prion Protein nachgewiesen wird, hängt davon ab, wie das Gewebe vorbehandelt wird. So wird beispielsweise in einer von O'ROURKE et al. (1998) entwickelten Methode das Gewebe erst bei 121°C in A. dest. autoklaviert und dann PrP^{Sc} mit mAK F89/160.1.5 in den

entsprechenden Gewebeschnitten nachgewiesen. Dies ist z. B. eine Technik für Antikörper, die gegen lineare Sequenzen des Prion Proteins gerichtet sind und ohne eine spezielle Vorbehandlung des zu untersuchenden Gewebes nicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} unterscheiden können.

Der Vorteil der Immunhistochemie gegenüber Western-Blot und EIA ist, dass das PrP^C oder PrP^{Sc} im natürlichen Gewebekontext sichtbar wird und somit genau lokalisiert werden kann.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

6-Aminohexanoic acid (ϵ -Amino-n-Capronsäure)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A-2504)
Bovines Serumalbumin (BSA)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A-7030)
Casein	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C-8654)
Coomassie-Tabletten	
PhastGel® Blue R	(Amersham Pharmacia Biotech, 17-0518-01)
Citronensäure-Monohydrat	(Riedel-de Haën, 33114)
D(+) Glucose-Monohydrat	(Merck, 1.08342.1000)
Essigsäure 100% (Eisessig)	(Merck, 1.00058)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, E-5134)
ExtrAvidin-HRP	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, E-2886)
Fetales Kälberserum	(Biochrom AG, S-0115)
Glycerin etwa 87% (Glycerol reinst)	(Merck, 1.04091.1000)
Guanidin-Thiocyanat (Guanidin-SCN)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, G-9277)
Igepal CA-630	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, I-3021)
Isopropanol (2-Propanol)	(Riedel-de Haën, 59310)
Kalilauge	(Riedel-de Haën, 35113)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Riedel-de Haën, 30407)
Lipase aus <i>Candida rugosa</i>	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, L1754-5G)
2-Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, M-6250)
Methanol	(Riedel-de-Haën, 32213)
γ -Morpholino-popansulfonsäure (MOPS)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, M-1254)
Natriumchlorid	(Riedel-de Haën, 31434)
Natriumduodecylsulfat (SDS)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, L-4590)
Natriumphosphat, dibasisch	(Riedel-de Haën, 30427)
Natronlauge, 1 mol/l	(Roth, K021.1)
Phenol/ Chloroform/ Isoamyl Alkohol (25:24:1, [v/v])	(Invitrogen, 15593-031)
Proteinase K, aus <i>Titrachium album</i> , 42 units/mg solid	(Sigma, P 2308)
Salzsäure, 5 mol/l	(Merck, 1.09911.0001)
Schwefelsäure 95-97%	(Riedel-de Haën, 30743)

3,3',5,5' Tetramethylbenzidin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-2885)
Tris (Trizma Base)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T-1503)
Tween 20	(Riedel-de Haën, 63158)
Wasserstoffperoxid 30%	(Merck, 8597)

3.1.2 Immunreagenzien

mAK P4	(r-Biopharm, R8007)
mAK V5B2	(r-Biopharm, R8009)
mAK L42	(r-Biopharm, R8005)
mAK 6H4	(Prionics, 01-010)
Kaninchen anti Maus- Immunglobulin/HRP	(DakoCytomation Denmark, P0161)

3.1.3 Lösungen und Puffer

Mehrfach verwendete Lösungen und Puffer

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

0,01 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,3) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl

PK-Stammlösung:

5 mg/ml PK in PBS; pH 7,8

Herstellung der Gewebehomogenate

Extraktionslösung:

PBS mit Zusatz von 3% [w/v] Glucose

Rahmaufarbeitung

Lipase Stammlösung :

10.000U/ml in 0,1 molarem Tris-HCL-Puffer pH 7,8) jeweils am Tag des Lipasever-
daus frisch angesetzt)

Lipase-Gebrauchslösung A (100U/ml):

Stammlösung 1:100 verdünnt

Lipase-Gebrauchslösung B (200U/ml):

Stammlösung 1: 50 verdünnt

Proteinfällung:

90% Isopropanol-Lösung bzw. 5mM EDTA/90% Isopropanol-Lösung.

Zitronensäurelösung:

9,14 mmol/l Zitronensäure mit Zusatz von 137,0 mmol/l NaCl (pH 7)

Enzymimmunoassay

Absättigungslösung:	3% [v/v] Fetales Kälberserum/PBS-Lösung
Waschlösung:	0,15 mol/l NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,025% [v/v] Tween 20
Probenverdünnungspuffer:	1% [w/v] BSA/PBS
Modifizierter Phosphatpuffer:	Phosphatpuffer (0,01 mol/l, pH 7,6 mit Zusatz von 138 mmol/l NaCl, 2,68 mmol/l KCl und 0,05 % [v/v] Tween 20
Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS):	10 mmol/l Tris/HCl (pH 7,4) mit Zusatz von 150 mmol/l NaCl
Antikörperpuffer:	modifizierter Phosphatpuffer mit Zusatz von 5% [v/v] fetalem Kälberserum und 5% [v/v] TBS
Modifizierter Citratpuffer:	Citratpuffer (0,21 mol/l; pH 3,9) mit Zusatz von 3,15 mol/l H ₂ O ₂
Tetramethylbenzidinlösung:	1 mmol/3,3',5,5' – Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45ml Methanol
Substrat / Chromogenlösung nach GALLATI & PRACHT (1985):	20 Teile modifizierter Citratpuffer und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung
Stopp- Reagenz:	1 mol/l H ₂ SO ₄ in A. dest.

Western-Blot

SDS-Puffer:

0,03 mol/l Tris/HCl, pH 8,0, mit Zusatz von 3mmol/l EDTA und 7,5 % SDS

SDS- Probenpuffer: Volumenverhältnis für 15 µl Proteinlysate

7,5 µl SDS-Puffer, 7,0 µl XT Sample Buffer, 1,5 µl XT Reducing Agent.

MOPS-Laufpuffer SDS-PAGE:

0,05 mol/l MOPS, 0,05 mol/l Trizma; 3,47 mmol/l SDS sowie 0,62 mmol/l EDTA

Puffer für Western-Transfer:

Anodenlösung I: 307,0 mmol/l Tris mit 20 % [v/v] Methanol in A. dest.

Anodenlösung II: 24,93 mmol/l Tris mit 20 % [v/v] Methanol in A. dest.

Kathodenlösung: 39,95 mmol/l ϵ -Amino-n-Caprinsäure mit 20 % [v/v] Methanol in A. dest.

Absättigung der Membran (auch als Verdünnungs-Lösung für Antikörper verwendet):

3% [w/v] Casein-PBS mit 0,025 % [v/v] Tween 20

PBS-Tween-Waschlösung:

PBS mit 0,025% [v/v] Tween 20

Coomassie-Färbung

Coomassie-Stammlösung:

1 Coomassie-Tablette PhastGel® Blue R mit 60% [v/v] Methanol in A. dest.

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie-Stammlösung mit Zusatz von 10 % Eisessig

Entfärber:

10 % [v/v] Eisessig mit 30 % [v/v] Methanol in A. dest.

Fixierlösung:

5 % [v/v] Glycerol mit 10 % [v/v] Eisessig in A. dest.

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Für die Gewebeprobenentnahme am Schlachthof:

Cellstar PP-Test tubes 50 ml	(Greiner bio-one, 210261)
Skalpelli Griff Gr. 3	(Plazotta, 5690)
Skalpelli klingen 40 mm, Fig.10	(Zefa, 3351180640)
Chirurgische Pinzette 14,5 cm	(Plazotta, 9960)

Herstellung der Gewebehomogenate:

Lysing Matrix D	(Q-Biogene, 6913-100)
BSE-Spritze zur Probenentnahme	(BIO-RAD, 355-1121)
BSE-Spritze für den kalibrierten Proben transfer	(BIO-RAD, 355-1123)
BSE-Nadel für den kalibrierten Proben transfer	(BIO-RAD, 355-1124)
Kryoröhrchen 1,8 ml	(Nunc, 377267)

Milchaufarbeitung:

Cellstar PP-Test tubes 50 ml	(Greiner bio-one, 210261)
Safe-Lock-Tubes 1,5 ml	(Eppendorf, 0030120.086)

Safe-Lock-Tubes 2 ml	(Eppendorf, 0030120.094)
Wattestäbchen	(neoLab, 2-1017)

Rahmaufarbeitung:

Pasteur-Pipetten aus Polyethylen	(neoLab, 1-6157)
Rührspatel 120mm	(Sarstedt, 81970)
PP-Röhrchen, steril, 15ml	(Greiner bio-one, 188261)

Enzymimmunoassay:

Mikrotiterplatten F8 MaxiSorp loose	(Nunc, 469949)
Mikrotiterplatten F96 MaxiSorp loose	(Nunc, 068705)
12-Kanalpipette research variabel 30-300µl	(Eppendorf)
Pipette Reference variabel 100-100µl, 10-100µl	(Eppendorf)
Pipette Research variabel 0,5-10µl	(Eppendorf)
PS-Röhrchen, 12 ml	(Greiner bio-one, 160101)
Papierhandtücher Cilan krepp	(Contreda-papier GmbH, 22716-000)

Western-Blot:

XT Sample Buffer, 4x	(BIO-RAD, 161-0791)
XT Reducing Agent, 20x	(BIO-RAD, 161-0792)
Tricine Sample Buffer	(BIO-RAD, 161-0739)
10x Tris/ Tricine/SDS-Puffer	(BIO-RAD, 161-0744)
Criterion™ XT Precast Gel, 12% Bis-Tris, 30µl	(BIO-RAD, 345-0118)
Criterion™ Precast Gel, 16% Tris-Tricine/Peptide	(BIO-RAD, 345-0063)
SeeBlue® Plus 2 Pre-Stained Standard	(Invitrogen, LC5925)
Immobilon™ -P PVDF Transfer Membran	(Millipore, IPVH304F0)
Immobilon™ -PSQ PVDF Transfer Membran	(Millipore, ISEQ26260)
Electrode Paper	(GE Healthcare, 80-1106-19)

3.1.5 Geräte**Milchaufarbeitung**

Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	(Kendro, Langenselbold)
Biofuge pico	(Kendro, Langenselbold)
Überkopfschüttler „Intelli-Mixer“	(neoLab, Heidelberg)

Herstellung der Homogenate

Tischwaage BL150S

(Sartorius, Göttingen)

RiboLyser

(Hybaid, Ashford)

Rahmaufarbeitung

Tischwaage BL150S

(Sartorius, Göttingen)

Reagenzrohrschüttler "Press-to-mix 34524"

(Snijders, Tilburg)

Thermomixer Comfort

(Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

Biofuge pico

(Kendro, Langenselbold)

Enzymimmunoassay

Reagenzrohrschüttler "Press-to-mix 34524"

(Snijders, Tilburg)

Taumler Reax 3

(Heidolph, Schwabach)

Biofuge pico

(Kendro, Langenselbold)

Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R

(Kendro, Langenselbold)

ELISA-Reader Sunrise

(Tecan, Crailsheim)

Western-Blot

Heizblock mit Magnetrührer

(Omnilab, Bremen)

Biofuge pico

(Kendro, Langenselbold)

Kammer für SDS-PAGE:

Criterion (BIO-RAD)

Spannungsgeber für SDS-PAGE:

Power Pac HC™ (BIO-RAD)

Blotting-Kammer:

2117 Multiphor (LKB Bromma)

Spannungsgeber für Blotting:

Electrophoresis Power Supply EPS

3500XL (Pharmacia Biotech)

Bilddokumentation:

Kodak Image Station (biostep)

3.2 Milch- und Euterwebeproben

3.2.1 Proben klinisch gesunder Tiere

Für die tierartvergleichende Untersuchung auf PrP^c standen die in Tab. 5 aufgelisteten Materialien zur Verfügung.

Tabelle 5: Proben klinisch gesunder Tiere

Tierart	Herkunft	Tierzahl		Material	
				Eutergewebe	Milch
Rind	Betrieb 1	10		10	0
	Betrieb 2	5		0	Vollmilch von 2 Abnahmen
Schaf	Betrieb 3	11		11	0
	Betrieb 4	8		0	Vollmilch von 2 Abnahmen
	Betrieb 4	1		0	1x wöchentlich Abnahme über die gesamte Laktationsperiode
Ziege	Betrieb 5	insges.	21	13	21
		davon	12	12	12
		und	8	0	8
		und	1	1	0

Ein Teil der Tiere aus Betrieb 1 und deren Daten sind identisch mit Tieren, die für die Publikation von DIDIER et al. (2006) in Western-Blot und EIA untersucht wurden. Diese Daten wurden zum besseren Vergleich in die vorliegende Arbeit mitaufgenommen.

3.2.2. Proben TSE-infizierter Tiere

In Tab. 6 sind die Proben von BSE-Rindern, in Tab. 7 die Proben der BSE bzw. Scrapie infizierten Schafe aufgelistet.

Tabelle 6: Proben von BSE-Rindern:

Tierart	Kategorie	Proben- anzahl (ges.)	Tier- zahl	Material		
				Euter	Milch	
				Gewebe	Vollmilch	Magermilch
Rind	BSE (VLA)	6	3	3	0	3
	BSE (FLI)	1	1	0	1*	0

* milchartiges Sekret

Tabelle 7: Proben von TSE-infizierten Schafen

Material Tierzahl	Kategorie	nur Kolostrum	Kolostrum und Vollmilch	nur Vollmilch	Gesamtproben- zahl Milch
70 Schafe	BSE	6	je 47	17	117
14 Schafe	Scrapie	9	je 2	1	14

Die sechs Proben vom Rind stammten von BSE-positiv getesteten, klinisch erkrankten Kühen aus dem Archiv der Veterinary Laboratories Agency (VLA, Weybridge, England) und wurden unserem Institut dankenswerterweise zugeteilt. Zusätzlich schickte das Friedrich-Löffler-Institut (FLI), das Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit auf der Insel Riems, das milchartige Sekret einer Färsen, das wie Milch aufgearbeitet wurde. Sämtliche Milchproben vom Schaf wurden dankenswerterweise von Dr. S. Bellworthy, VLA, zur Verfügung gestellt. Sie stammten von künstlich mit BSE bzw. Scrapie infizierten Tieren.

3.2.3 Kontrollmaterial für Western-Blot und EIA

Als Positivkontrolle für den Nachweis von PrP^C stand Stammhirngewebe gesunder Tiere der Spezies Rind, Schaf und Ziege aus den örtlichen Schlachthöfen zur Verfügung.

Die *Medulla oblongata* eines an Scrapie erkrankten Schafes und eines an BSE erkrankten Rindes dienten als Positivkontrollen für den Nachweis von PrP^{res}. Beide wurden freundlicherweise von Prof. M. Groschup, FLI zur Verfügung gestellt.

Als Negativkontrolle für die Rahmaufarbeitung und den EIA bzw. Western-Blot im Anschluss diente gepoolte Milch bzw. gepooltes Kolostrum von fünf gesunden Schafen.

3.3 Für die immunchemischen Methoden verwendete Antikörper

Zum besseren Verständnis soll an dieser Stelle auf die Epitope der verwendeten spezifischen Antikörper (Abb. 3) eingegangen werden. Der monoklonale Antikörper (mAk) P4 sowie mAk ICSM 35 binden N-terminal, zum Ende der Oktarepeats. V5B2 hingegen hat sein Epitop sehr weit C-terminal. L42, 6H4, ICSM 18 und 12F10 treten mit einer Aminosäuresequenz der globulären Struktur in der Mitte des Proteins in Wechselwirkung.

Beim Sandwich-EIA wurde die Detektion mit P4 (HARMEYER et al., 1998) und V5B2 (ŠERBEC et al., 2003) durchgeführt. Für die Detektion im Western-Blot wurde P4 verwendet. Zum Vergleich wurden auch einige Western-Blots mit 6H4 (KORTH et al., 1997) oder L42 (HARMEYER et al., 1998) durchgeführt. Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten bei den gesunden Tieren mit L42 bzw. P4. Bei den TSE-infizierten Tieren wurde mAk 12F10 für die Immunhistochemie verwendet. Der PrionScreen® beinhaltet die mAk ICSM 18 und ICSM 35.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Schaf	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG	-----	GWGQPH	GGGG						
Ziege	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG	-----	GWGQPH	GGGG						
Rind	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG	GWGQPHGGGGWGQPHGG	GGGG							
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Schaf	WGQGGSHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITVKQHTV									
Ziege	WGQGGSHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITVKQHTV									
Rind	WGQGGTHGQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGSDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITVKEHTV									
	ICSM 35	mAK P4		ICSM 18	12F10	mAK 6H4	mAK L42			
	210	220	230	240	250	260				
Schaf	TTTTKGENFTETDIKIMEQVVEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG									
Ziege	TTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG									
Rind	TTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG									
		mAK V5B2								

Abbildung 3: Aminosäuresequenzen des PrP^C der drei Wiederkäuerspezies Schaf (nach BELT et al., 1996; 256 Aminosäuren), Ziege (nach WOPFNER et al., 1999; 256 Aminosäuresequenzen) und Rind (nach HILLS et al., 2001; 264 Aminosäuren). Die Nummerierung bezieht sich auf die Rindersequenz. Aminosäuredifferenzen zwischen den einzelnen Arten wurden durch fett gedruckte Buchstaben hervorgehoben. Ebenfalls derart markiert wurde Aminosäure 143 der Ziege (entspricht Position 151 in der Abbildung), da bei anderen Autoren (VACCARI et al., 2002; WU et al., 2004) Arginin anstatt Histidin für diese Stelle angegeben wird. Die Epitope, die von den in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörpern (mAk) erkannt werden, wurden farbig unterlegt und mit dem Namen des jeweiligen mAk versehen.

3.4 Methoden

Bei den im Folgenden beschriebenen Methoden wurde in einem L3** Labor gearbeitet. Die Dekontamination aller Verbrauchsmaterialien erfolgte gemäß den EU- bzw. den nationalen Richtlinien.

3.4.1 Herstellung der Homogenate aus Hirn- und Eutergewebe

Vor der Homogenisierung wurden die verschiedenen Gewebe mit Hilfe einer Skalpellklinge zerkleinert. Jeweils 400 mg Gewebe wurden in Lysing Matrix D-Röhrchen eingewogen und mit 1,2 ml Extraktionslösung versetzt. Dann erfolgte die Homogenisierung im Ribolyser für 45 sec bei 6,5 m/sec. Mit Hilfe einer Spritzen-Nadel-Kombination für den kalibrierten Proben-Transfer wurde das Homogenat zur Weiterverarbeitung in Kryotubes bzw. 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Bei dieser Aufarbeitung (400 mg/1,2 ml Glucose-PBS) wurde das Homogenat 1:4 verdünnt. Alternativ wurden auch 200 mg Gewebe in 1,1 ml Glucose/PBS homogenisiert. Hierbei betrug die Verdünnung 1: 6,5.

Derart gewonnene Euterproben wurden bei gesunden Tiere stets direkt in EIA bzw. WB eingesetzt. Bei den Euterproben der BSE-Kühe hingegen wurden folgende Variationen für den Einsatz im Western-Blot zubereitet:

Tabelle 8: Übersicht über die Aufarbeitungsvarianten von Eutergewebe

Variante	Aufarbeitung
a1)	Euterhomogenat 400mg/1,2 ml Glucose-PBS ohne PK
a2)	Euterhomogenat 400mg/1,2 ml Glucose-PBS + 2,5 µg/ml PK
b)	100 µl a) mit 0,1 [v/v] SDS und 0,1 % [v/v] Igepal versetzt + 2,5 µg/ml PK
c)	100 µl a) + 2,5 µg/ml PK, auf 1 mol/l Guanidin-Isothiocyanat eingestellt

Der PK-Verdau erfolgte für 30 min bei 42 °C. Danach wurde c) auf 1 mol/l Guanidin-Isothiocyanat eingestellt. Alle Proben wurden anschließend 5 min im Wasserbad gekocht.

3.4.2 Milchaufarbeitung

Fraktionierte Gewinnung von Rahm, Magermilch und Molke:

Zur Aufarbeitung mithilfe einer differentiellen Zentrifugation wurden 100 ml Vollmilch eingesetzt. Diese wurde in einem ersten Schritt bei 1800 x g 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die dadurch erhaltene Rahmschicht wurde abgeschöpft und bis zur weiteren Bearbeitung separat gelagert, ebenso die Magermilch. Anschließend wurden die pelletierten somatischen Zellen der Milch weiter aufgearbeitet. Ein Aliquot von jeder Milchfraktion wurde als Rückstellprobe aufbewahrt.

Aufarbeitung der somatischen Zellen der Milch:

Die Milchzellen wurden in PBS suspendiert und dreimal gewaschen, wobei die jeweilige Zentrifugation bei 480 x g für 15 min bei 4 °C erfolgte. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 60 µl PBS aufgenommen. Das suspendierte Pellet wurde wie folgt aufgeteilt:

- 15 µl Zellsuspension wurden mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht und so eingefroren. Für den Einsatz im EIA mussten die Zellen direkt vorher durch dreimaliges Frieren (je 10 min in flüssigem Stickstoff) und anschließendes Auftauen zur Ruptur gebracht werden
- 15 µl für den Einsatz im WB; die Zellsuspension wurde gleich anschließend im SDS-Probenpuffer (s. 3.1.3) gekocht und bei -20 °C bis zum Einsatz aufbewahrt
- 30 µl als Rückstellprobe

Bei den Milchproben von infizierten Tieren konnten keine somatischen Milchzellen gewonnen werden, da die Proben gefroren geliefert wurden. Durch den Auftauprozess rupturierten die Zellen und waren einer Gewinnung nicht mehr zugänglich.

Molkefällung:

Der pH-Wert der Magermilch wurde mit 2 M Salzsäure auf pH 3-4 eingestellt, die Magermilch 10 min in einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend 20 min bei 4 °C und 2500 x g zentrifugiert. Die Molke wurde abgenommen. War die Molke noch trüb oder hatte sich kein Kasein abgesetzt, wurde erneut HCl zugegeben und zentrifugiert. Schließlich wurde die gewonnene Molke mit 1 M Natronlauge neutralisiert und eingefroren.

Kaseinaufarbeitung:

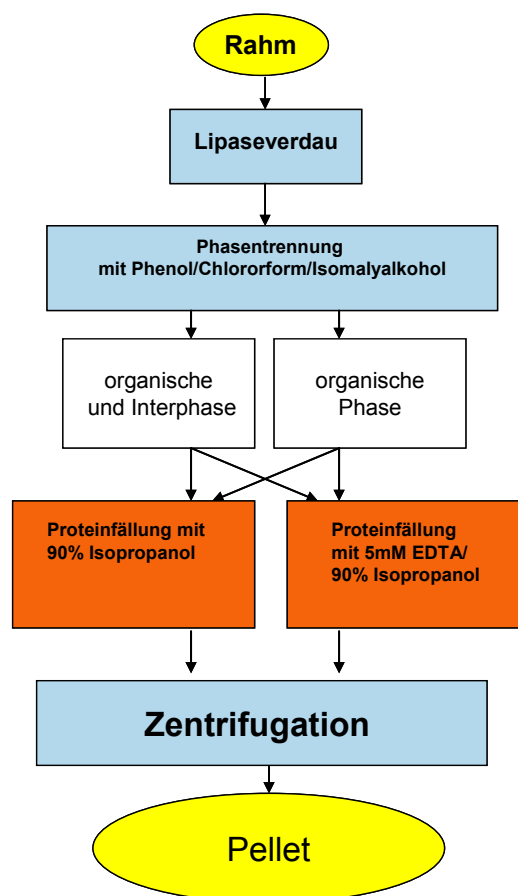
Das aus der Molkefällung resultierende Kasein wurde im frischen Zustand zu lösen versucht und neutralisiert. Dazu wurde das aus 2 ml Magermilch vom Schaf gewonnene Kasein mit folgenden Substanzen versetzt:

Tabelle 9: Lösung und Neutralisation von Kasein

Lösungsmittel	Menge	Neutralisation mit	weitere Zugaben
PBS	1000 µl	20 µl NaOH, 1 molar	
PBS	500 µl	20 µl NaOH, 1 molar	
PBS	100µl	20 µl NaOH, 1 molar	+ 400µl PBS
Harnstoff, 1 molar	500 µl	20 µl NaOH, 1 molar	
Harnstoff, 3 molar	500 µl	20 µl NaOH, 1 molar	
Harnstoff, 5 molar	500 µl	20 µl NaOH, 1 molar	

3.4.3 Etablierung eines Protokolls zur Rahmaufarbeitung

Für die Rahmaufarbeitung wurde die von BASTIAN et al. (2005) publizierte Methode im Hinblick auf die Ansprüche der hier untersuchten Probenmatrices modifiziert. Zur Methodenetablierung wurden verschiedene Varianten ausprobiert, die zur Übersicht in Abb. 4 dargestellt sind. Die Möglichkeiten der weiteren Verarbeitung und des Einsatzes in den verschiedenen Nachweismethoden zeigt dann Abb. 5.

**Abbildung 4:** Methodenetablierung zur Rahmaufarbeitung

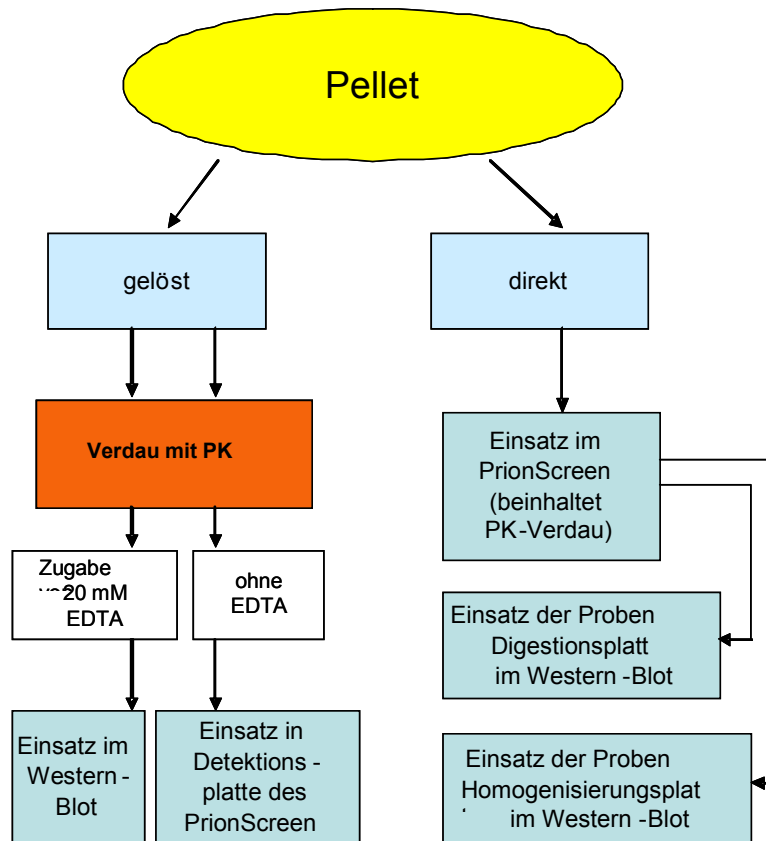


Abbildung 5: Weiterverarbeitung des Proteinpellets aus Rahm und Einsatz in den verschiedenen Nachweismethoden

Im Folgenden wird zunächst das letztlich zur Untersuchung der Proben verwendete Protokoll beschrieben und anschließend auf die Varianten (Abb. 4 bzw. 5) eingegangen. Jeweils 250 mg Rahm wurden eingewogen und mit 500 µl der Lipase-Gebrauchslösung A (entspricht 50 IU) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 50 min bei 37 °C. Danach wurden 220 µl Phenol/Choroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zugegeben. Die Probe wurde gevortext und anschließend für 20 min bei 12.280 x g zentrifugiert. Dadurch erfolgte eine Phasentrennung in eine obere wässrige Phase, eine Interphase und eine untere organische Phase. Die wässrige Phase wurde verworfen. Inter- und organische Phase wurden gut gemischt und mit der fünffachen Menge 90 % Isopropanol versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt (20 min, 12.280 x g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 10 bis 15 min getrocknet.

Alle Proteinpellets wurden bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Es erfolgte der direkte Einsatz im PrionScreen®-EIA, der den PK-Verdau beinhaltet (s. 3.4.9) und die Analyse eines Aliquots aus der Digestionsplatte des PrionScreen® im hauseigenen Western-Blot (Abb. 5).

Während der Methodenetablierung wurde versucht, nur mit der organischen Phase weiterzuarbeiten. Diese Vorgehensweise entspricht dem Protokoll nach BASTIAN et al. (2005). Auch wurde der Einsatz von 5 mmol EDTA in 90% Isopropanollösung zur Proteinfällung (Abb. 4) oder die Zugabe von 20 mM EDTA zum gelösten Pellet nach dem PK-Verdau und vor Inaktivierung der PK (Abb. 5) zur Optimierung der Löslichkeit bzw. der Detektion getestet. Des Weiteren kam das Proteinpellet gelöst zum Einsatz in den hauseigenen Western-Blot oder auf die Detektionsplatte des PrionScreen®. Dazu wurde es entweder in 220 µl PBS oder alternativ zur Verbesserung der Löslichkeit in 220 µl Citratlösung (pH 7,0) oder in 220 µl 1% Igepal/PBS gelöst. Letztlich erwies sich jedoch die direkte mechanische Homogenisierung des Proteinpellets im PrionScreen® als notwendig.

3.4.4 Verdau mit Proteinase K

Für den Einsatz von Molke im Sandwich-EIA oder im PrionScreen®-EIA wurde ein Probenäquivalent direkt nach der Fällung mit 2,5 µg/µl PK bei 37°C für 40 min inkubiert und diese durch fünfminütiges Erhitzen auf 100°C inaktiviert. Ein anderes Probenäquivalent blieb unverdaut. Für den Einsatz im Western-Blot wurde nach der PK-Inkubation noch die entsprechenden Mengen SDS-Probenpuffer (s. 3.1.3) zugegeben und die PK durch fünfminütiges Kochen inaktiviert.

Das Pellet aus der Rahmaufarbeitung wurde in 220 µl der unterschiedlichen Lösungspuffer gelöst (s. 3.4.3) und für den Verdau mit Proteinase K je 100 µl der Lösung in zwei neue Reaktionsgefäße überführt. Der eine Teil wurde unverdaut belassen, der andere mit 5 µl PK-Stammlösung (entspricht 2,5 µg/µl) versetzt. Beide wurden 40 min bei 37°C inkubiert, anschließend fünf Minuten im Wasserbad gekocht und bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.5 Modifikationen der Aufarbeitung von Molke für den Einsatz im Western-Blot

Für hochvisköse und fetthaltige Molkeproben aus Kolostralmilch wurde die Probenaufarbeitung angelehnt an die Rahmextraktion leicht modifiziert. Durch Zugabe von 250 µl Lipase-Gebrauchslösung B (200 U/ml) zu 250 µl Molke wurden die in der Molke verbliebenen Fettbestandteile verdaut und anschließend wieder mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Isopropanol aufgearbeitet. Das so gewonnene Pellet wurde in 220 µl PBS gelöst und so im Western-Blot bzw. Sandwich-EIA eingesetzt.

3.4.6 Sandwich-EIA

Der Sandwich-EIA wurde wie von BOESEN (2005) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde der monoklonale Antikörper V5B2 nach einem Verfahren von HETZELT (2005) mit Biotin markiert.

Mikrotiterplatten wurden mit mAK P4 in einer Konzentration von 5 µg/ml (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Aufbewahrung bis zur Benutzung der Platten bei 4 °C.

Nach Leeren der Platten wurden die noch vorhandenen freien Bindungsstellen mit 3 % FCS/PBS für 30 min abgesättigt. Es folgten drei Waschschrte. Hierzu wurde jeweils Waschlösung in alle Kavitäten gegeben und die Platte anschließend auf Papierhandtüchern ausgeklopft. Anschließend wurden die Proben in der unverdünnten Ausgangslösung (s. u.) aufgetragen, sowie zwei-, vier- und achtfach in 1% BSA/PBS auf der Platte verdünnt (50 µl/Kavität). Das als Positivkontrolle dienende Hirnhomogenat (s. 3.3.1) wurde in zweifacher bis 128-facher Verdünnung auf die Platte gegeben. Zusätzlich wurden die Proben nach PK-Verdau aufgetragen. Simultan wurde der biotinylierte Antikörper V5B2 (2 µg/ml in Antikörperpuffer; 50 µl/Kavität) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und vier Waschschrten erfolgte die Zugabe des Peroxidase-Konjugates (ExtrAvidin®-HRP 1:2000 verdünnt in Antikörperpuffer; 100 µl/Kavität). Nach wiederum einstündiger Inkubation wurden fünf Waschschrte durchgeführt. Dann erfolgte die Zugabe der Substratlösung (100 µl /Kavität). Die einsetzende Farbreaktion wurde nach 30 min mit Schwefelsäure (1 mol/l), 100 µl/Kavität) gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm photometrisch in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA-Reader Sunrise). Als Cut-Off wurde der doppelte Leerwert angesetzt.

Ausgangskonzentrationen:

- Vollmilch, Magermilch und Molke unverdünnt d. h. Arbeitsverdünnung entspricht Gesamtverdünnung;
- Milchzellsuspension: Ausgangsverdünnung beträgt 1:16 der Gesamtzellzahl aus 100 ml Vollmilch
- Homogenate: je nach Herstellung
4-fach bei 400 mg/1,2 ml Extraktionslösung
oder 6,5-fach bei 200 mg/1,1 ml Extraktionslösung
- Rahm: als gelöstes Pellet aus Milchaufarbeitung

3.4.7 Darstellung von PrP^C/PrP^{res} mittels Western-Blot

Für den Western-Blot wurden die in 3.2.3 angegebenen und wie in 3.4.1 beschrieben homogenisierten Positiv- und Negativkontrollen mit PBS wie folgt verdünnt: *Medulla oblongata* vom Rind 1:4, von der Ziege 1:40, vom gesunden Schaf 1:20 und vom Scrapie-Schaf 1:40. Sie wurden direkt bzw. nach Zugabe von Guanidin-Isothiocyanat (s. 3.4.1 Variante c) mit SDS-Probenpuffer versetzt.

Bei den Rahmproben der TSE-infizierten Schafe dienten Rahmproben aus gepooltem Kolostrum oder Milch gesunder Schafe, die den gesamten Aufarbeitungsprozess durchliefen, als Negativkontrolle.

Nach Zugabe des SDS-Probenpuffers wurden die Proben 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend kurz anzentrifugiert. Es wurden je 20 µl einer Probe auf das 12% Bis-Tris-haltige Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die SDS-PAGE für eineinhalb Stunden bei 150 V in einem MOPS-Laufpuffer in einem Criterion Precast Gel System durchgeführt.

Anschließend erfolgte das Blotting in einer Semidry-Kammer. Hierzu wurde diese folgendermaßen befüllt: Anodenseitig wurden die in Anodenpuffer I (6 Papiere) bzw. II (3 Papiere) getauchten Filterpapiere gelegt, eine PVDF-Membran darauf, auf diese kam das Polyacrylamid-Gel; es wurde mit den mit Kathodenpuffer benässten Filterpapieren (9 Papiere) bedeckt. Bei einer Blotting-Zeit von 70 min wurde die empfohlene Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Blotfläche angelegt (WESTERMEIER, 1990). An der fertig geblotteten Membran wurden die Banden des Proteinmarkers eingekerbt und danach die Membran über Nacht zur Absättigung in 3% Casein-PBS mit 0,025% Tween 20 bei 4°C aufbewahrt.

Am nächsten Morgen wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Detektionsantikörper P4 (5 µg/ml) in der oben beschriebenen Casein-Lösung inkubiert. Falls in manchen Fällen bei Proben von TSE-infizierten Tieren zur Verbesserung der Bandenintensität mit einer Konzentration von 7,5 µg/ml gearbeitet wurde, ist dies bei den entsprechenden Abbildungen im Ergebnisteil gesondert vermerkt. Anschließend wurde dreimal für 10 min unter leichtem Schwenken in PBS-Tween gewaschen. Danach wurde Casein-Lösung mit ExtrAvidin®-HRP in einem Verhältnis von 1:3000 auf die Membran gegeben und 60 min lang inkubieren lassen. Wieder erfolgten drei zehnminütige Waschschrte mit PBS-Tween und zuletzt zweimal mit reinem PBS. Nach Auftragen des Chemolumineszenz-Substrates wurden Bilder mit verschiedener Belichtungsdauer in einer Kodak Image Station angefertigt.

3.4.8 SDS-PAGE mit Tris/Tricine-Gel und Coomassie-Färbung zur Detektion trunkierter PrP Formen

Diese alternative Form der SDS-PAGE diene zur besseren Darstellung der trunkierten Formen von PrP^C. Als Kontrolle diene das *Medulla oblongata*- Homogenat von Schaf 5 Burgstall, hier jedoch nur 1:10 verdünnt eingesetzt. Ein Teil Probe (30 µl Schaf-Molke, 20 µl Ziegen-Molke) wurde mit einem Teil Sample Buffer (Tricine Sample Buffer mit Zusatz von 2% [v/v] Mercaptoethanol) versetzt und 5-10 min im Wasserbad gekocht. Je 30 µl des Probenaliquots wurden auf das 16,5 % Tris-Tricine/Peptide Criterion Precast Gel aufgetragen und die SDS-PAGE mit dem Tris/Tricine/SDS-Laufpuffer bei 100 V in einem Criterion Precast Gel System durchgeführt. Die benötigte Laufzeit betrug 130 min.

Danach wurde das Gel geteilt, die eine Hälfte geblottet, die andere mit Coomassie gefärbt. Das Blotting und die Immunodetektion wurden wie unter 3.4.7 beschrieben durchgeführt. Das Verfahren unterschied sich allerdings dadurch, dass für den Probentransfer eine Immobilon-PSQ PVDF-Membran verwendet wurde.

Zur Coomassie-Färbung wurde der zweite Teil des SDS-Gels 40 min in die Färbelösung gegeben, danach 120-180 min in Entfärber gelegt und leicht geschüttelt bis eine deutliche Entfärbung eingetreten war. Anschließend erfolgte die Fixierung über Nacht bei 4°C in Fixierlösung. Der geblottete Gelanteil wurde ebenfalls Coomassie gefärbt, um die Effizienz des Blotting-Vorgangs zu kontrollieren.

3.4.9 Analyse von Rahmproben mittels PrionScreen®

Der PrionScreen®-EIA konnte freundlicherweise im Labor von Dr. Hloch bei Roche Diagnostics (Penzberg) durchgeführt werden. Der PrionScreen® ist ein EU-zugelassener Screening-Test zur Analyse von BSE in Hirngewebe von Rindern.

Für die Untersuchung im PrionScreen® kamen die Pellets direkt aus der Rahmaufarbeitung zum Einsatz. Hierzu wurde das Probenmaterial in die mit 300 bzw. 500 µl Homogenisierungslösung gefüllten Röhrchen der Homogenisierungsplatte gegeben. Die Kontrollen wurden gemäß der Gebrauchsanweisung mit 900 µl Kontroll-Lösung sowie 100 µl Kontrollreagenz versetzt. Die Röhrchen wurden mit dem Deckel verschlossen und in einen Schüttelhomogenisator gegeben. Hierin erfolgte die Homogenisierung bei 30 Hz. Nach 5 min wurde die Platte um 180° gedreht und nochmals 5 min geschüttelt. Anschließend wurde die

Homogenisierungsplatte entnommen und 2 min bei 1000 x g in einer Mikroplatten-Zentrifuge zentrifugiert.

Jeweils 150 µl der Kontrollen und der Proben auf die Digestionsplatte überführt. Diese wurde mit selbstklebender Folie abgedichtet und für 15 min bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gegeben (600 rpm). Nun folgte die Inkubation bei 42 °C für 30 min in einem Schüttel-Inkubator. Hierdurch erfolgte der Probenverdau durch Proteinase-K, welche bereits in der Homogenisierungslösung enthalten war. Anschließend wurden 100 µl Stopp-Reagenz jeder Kavität der Digestionsplatte zugefügt, durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und die Platte wiederum verschlossen. Es folgte eine Inkubation auf dem Schüttler bei 400 rpm für 20 min bei Raumtemperatur.

Nun wurden 40 µl jeder Kavität der Digestionsplatte auf die mit Streptavidin beschichtete Detektionsplatte transferiert. 200 µl Detektionslösung wurden pro Kavität zugegeben, durch Pipettieren vermischt und die Platte wieder verschlossen. Die Inkubation auf dem Schüttler erfolgte bei 400 rpm für 60 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Detektionsplatte dreimal mit je 300 µl Waschpuffer pro Kavität in einem automatischen EIA-Wascher gespült. Anschließend wurden die Platten mit 200 µl TMB-Substrat pro Kavität versetzt und abgedeckt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von 50 µl TMB-Stopplösung je Kavität beendete Farbentwicklung. Daraufhin wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Anschließend erfolgte die computergestützte Auswertung der erhaltenen Messwerte. Als Cut-Off wurde der doppelte Leerwert angesetzt.

Zur vergleichenden Analyse wurde ein Aliquot der Kontrollen und Proben der Digestionsplatte im Western-Blot wie unter 3.4.7 beschrieben eingesetzt. Ebenso wurde testweise mit einem Aliquot der Homogenisierungsplatte verfahren.

3.4.10 Immunhistochemischer Nachweis von PrP^C

Die Milchdrüsengewebeproben wurden direkt nach der Schlachtung aus der Tiefe der Euterviertel gewonnen und auf Würfel mit Kantenlänge 1 cm zugeschnitten. Eine Probe wurde in Bouin'scher Lösung für 48 h, eine zweite mit 2:1 [v/v] Methanol/Eisessig für 24 h immersionsfixiert.

Die Immunhistochemie der Proben von klinisch gesunden Tieren wurde freundlicherweise vom Labor von Prof. Amselgruber im Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere der Universität Hohenheim analog DIDIER et al. (2006) durchgeführt.

3.4.11 Immunhistochemischer Nachweis von PrP^{res}

Die Immunhistologische Untersuchung der Proben TSE-kranker Tiere wurde freundlicherweise im FLI durchgeführt.

Aus den in Paraffin eingebetteten Eutergewebeproben wurden 3-4 µm dicke Schnitte gewonnen, auf Super-Frost Plus Objektträger aufgezogen und mindestens 120 min bei 60 °C getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte durch zweimaliges Einlegen in Xylol für je 3 min und zweimaliges Eintauchen in Isopropanol für jeweils 3 min. Danach wurden die Schnitte durch jeweils dreiminütige Behandlung mit Alkohol absteigender Konzentration (96 %, 70 %, 50 %) rehydriert. Es folgte die Inkubation in konzentrierter Ameisensäure (98 %) für 15 min. Anschließend wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült und 30 min in neutral gepuffertem Formalin (3,5 %) inkubiert. Danach wurden sie zweimal für jeweils 5 min in PBS gespült.

Im Ventana Discovery Autostainer erfolgte die Inkubation mit Zitratpuffer bei 96 °C, mit 3% H₂O₂ in Methanol sowie mit Ziegenserum. Zur Detektion wurden die Schnitte mit mAK 12F10 (1:1800 in *antibody diluent* von Ventana) als erstem Antikörper, als Negativkontrolle mit mAK gegen GP5 des PRRS-Virus (1:600 in *antibody diluent* von Ventana) für 20 min inkubiert.

Nach der Inkubation mit Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (ABC-Komplex) wurde das Reaktionsprodukt mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung als Chromogen visualisiert.

Die Schnitte wurden anschließend für 2 min in A. dest. mit 0,1 % Tween eingelegt, durch jeweils zweiminütigen Verbleib in 70 % und dann 96 % Ethanol entwässert und zweimal für 2 min in Isopropanol gegeben. Daraufhin wurden die Schnitte in Xylol (zweimal 3 min) entalkoholisiert und mit Entellan eingedeckt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vergleichende Darstellung des PrP^C-Vorkommens in Eutergewebe und Milch bei Rind, Schaf und Ziege

Der erste Teil der Ergebnisdarstellung befasst sich mit dem tierart-spezifischen Vorkommen von PrP^C in der Milchdrüse und der Milch von Rind, Schaf und Ziege. Für den Nachweis im Eutergewebe kamen drei unabhängige immunchemische Methoden (EIA, Western-Blot und IHC) zum Einsatz; für den Nachweis in der Milch zwei (EIA, Western-Blot).

4.1.1 PrP^C-Expression im Eutergewebe

4.1.1.1 Sandwich-EIA

Die Zusammenfassung der Daten in Tabelle 10 zeigt, dass PrP^C mittels EIA bei allen untersuchten Spezies detektierbar war. Jedoch zeigten sich sowohl zwischen den Spezies als auch zwischen den Individuen einer Wiederkäuerart deutlich Unterschiede im Expressionsniveau. Zur besseren Darstellung der individuellen Variationsbreite sind die EIA Ergebnisse auf Einzeltierebene in Abb. 6 a-c dargestellt.

Tabelle 10: Im Eutergewebe mit EIA ermittelte PrP^C-Expression (Werte = EIA-Extinktionswerte)

Tierart	Positive Ergebnisse	Maximum	Minimum	Mittelwert	Standardabweichung
Rind	9/10	1,94	0,33	0,90	± 0,49
Schaf	6/11	0,49	0,04	0,15	± 0,14
Ziege	13/13	0,42	0,20	0,31	± 0,07

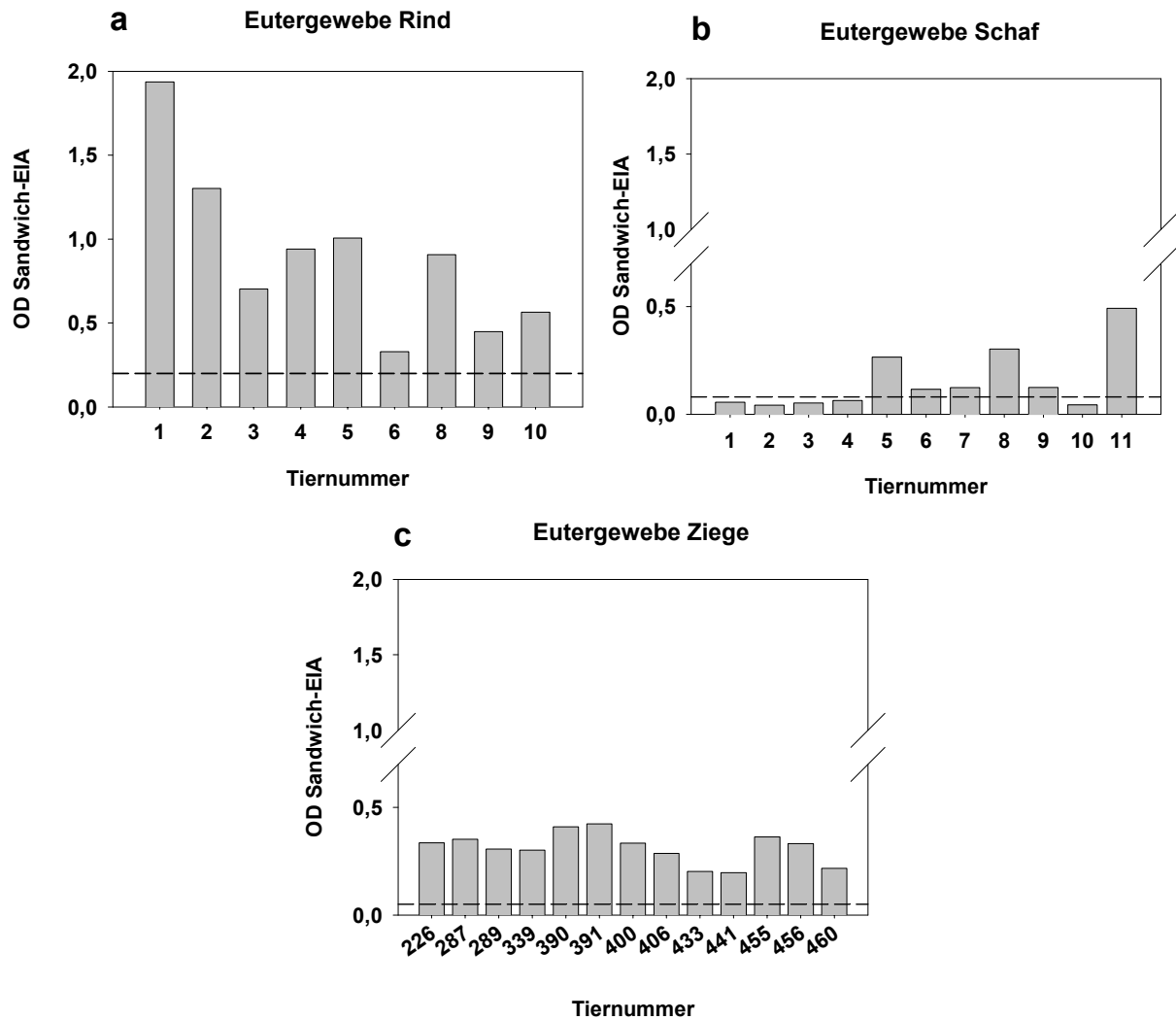


Abbildung 6: Individuelle EIA-Ergebnisse in Eutergewebe von Rind (a), Schaf (b) und Ziege (c) dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert jeweils den Cut-Off-Wert. Zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Tierarten wurde dieselbe Skalierung für die OD-Werte (OD = optical density entspricht der Extinktion bei 450 nm) gewählt.

4.1.1.2 Western-Blot

Als weitere immunochemische Methode zur Darstellung der verschiedenen PrP^C-Glykoformen wurden Euterhomogenate im Western-Blot untersucht. Die zugehörigen Abbildungen enthalten jeweils beispielhaft die Ergebnisse bei einigen Tieren.

Im Rind konnten mittels der oben genannten Methode die Ergebnisse des EIAs nicht bestätigt werden, wie Abb. 7a zeigt. Im Gegensatz dazu reagierte Euterhomogenat vom Schaf positiv im Western-Blot (Abb. 7b) und bestätigte damit die Ergebnisse des EIAs. Vornehmlich zeigten sich die zweifach glykosylierte Isoform bei ca. 38 kDa sowie die unglykosylierte bei 27 kDa. Die einfach glykosylierte Form trat nicht bei jedem Tier in Erscheinung. Grundsätzlich gab es individuelle Intensitätsunterschiede. Bei der Ziege zeigten sich im Western-Blot die drei für PrP^C typischen Glykoformen (un-, einfach, zweifach glykosyliert; Abb. 7c). Sie kamen etwa in gleicher Menge vor, wohingegen bei dem als Positivkontrolle dienenden Gehirn (Spur 7) die zweifach glykosylierte Form auf Höhe von ca. 38 kDa deutlich dominierte. Zusätzlich zeigte sich im Eutergewebe eine spezifische Bande auf Höhe von ca. 95 kDa (Abb. 7d).

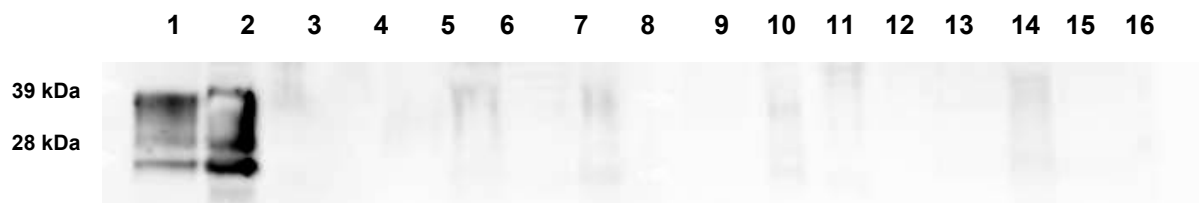


Abbildung 7a: Euterhomogenate vom Rind im Western-Blot.

Die Spuren 1-8 wurden mit PrP-spezifischen mAK P4 detektiert, die Spuren 9-16 zur Kontrolle ohne ihn. Spur 1, 2 + 9, 10 = Kalb 4 Medulla oblongata; Spur 3 + 4 und 11 + 12 = Rind 6; Spur 5 + 6 und 13 + 14 = Rind 7; Spur 7 + 8 und 15 + 16 = Rind 10; Spur 1+2: ohne PK, ansonsten jeweils Spuren mit ungerader Zahl ohne PK, geradzahlige Spur mit PK

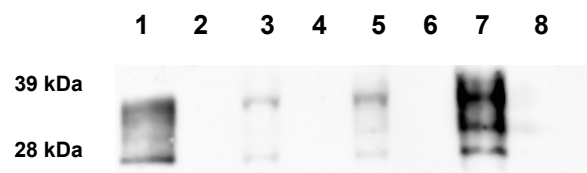


Abbildung 7b: Eutergewebe von drei Schafen im Western-Blot.

Die Spuren 2, 4, 6 + 8 enthalten mit PK versetztes Gewebe. Spur 1 + 2: *Medulla oblongata* Schaf 5; Spur 3 + 4: Schaf 2; Spur 5 + 6: Schaf 3; Spur 7 + 8: Schaf 4.

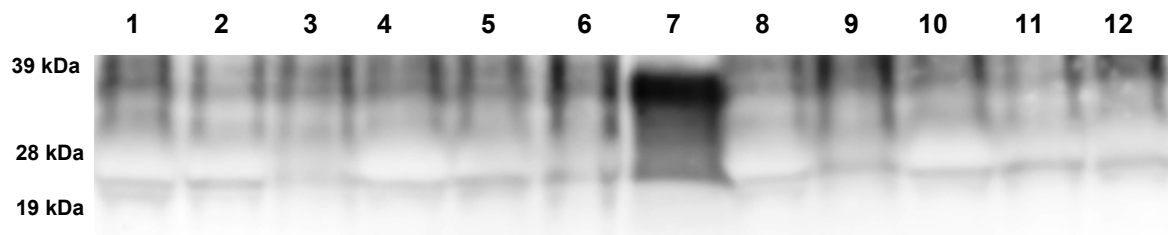


Abbildung 7c: Western-Blot des Eutergewebes von Ziegen

Alle Spuren wurden mit PrP-spezifischen mAK P4 detektiert. Spur 1-6: Eutergewebe Ziege Nr. 289, 339, 390, 400, 433, 460; Spur 7: Hirnhomogenat Ziege 1: 40; Spur 8-12: Eutergewebe Ziege Nr. 287, 391, 406, 441, 456

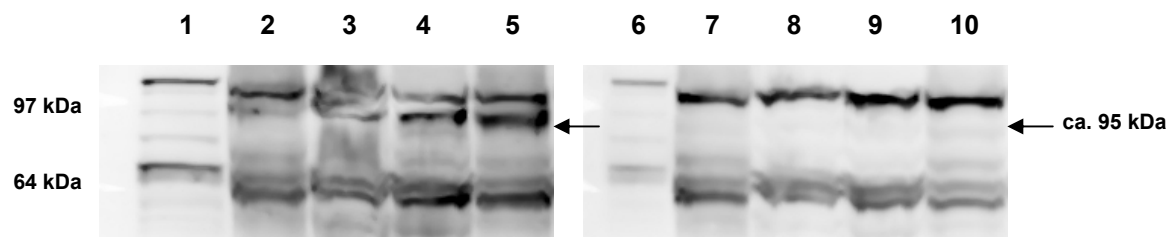


Abbildung 7d: Western-Blot des Eutergewebes von Ziegen

Die Spuren 1-5 wurden mit PrP-spezifischen mAK P4 detektiert, die Spuren 6-10 zur Ermittlung der Bandenspezifität ohne ihn. Spur 1 + 6: Homogenat Ziege *Medulla oblongata*; Spur 2 + 7: Ziege Nr. 287; Spur 3 + 8: Ziege Nr. 289; Spur 4 + 9: Ziege Nr. 391; Spur 5 + 10: Ziege Nr. 406. Mit Pfeil markiert wurde die Höhe von ca. 95 kDa, auf der sich im linken, P4 detektierten Teil bei den Euterhomogenaten eine Bande befindet, die sich durch das Fehlen im rechten Teil als spezifisch darstellt.

4.1.1.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte bei Rind und Schaf mit mAk L42, bei der Ziege mit mAk P4, da der erstgenannte Antikörper hier kein auswertbares Bild ergab. Es zeigte sich, dass PrP^C bei allen drei Tierarten nur von den Epithelzellen der Alveolen exprimiert wird (Abb. 8). Die ausgewählten Bilder stellen typische Ergebnisse von Mehrfach-Untersuchungen dar.

Beim Rind erfolgte die PrP^C-Expression lediglich in aktiv sezernierenden Laktozyten, wohingegen sie beim Schaf auch in der nicht-laktierenden Milchdrüse nachweisbar war

(nicht in der Abbildung gezeigt). Auf zellulärer Ebene war die Expression beim Rind vor allem auf die basalen Zellkompartimente und die Zellmembran beschränkt (siehe Bildausschnitt). Auch die Zellmembranen sind deutlich gefärbt, wie der Tangentialschnitt belegt (Pfeil). Im Gegensatz dazu war das PrP^C bei Schaf und Ziege homogener im Zytoplasma verteilt. Die kleinen Wiederkäuer zeigten im Gegensatz zum Rind die Abschnürung PrP^C-haltiger Partikel ins Drüsenlumen. Insgesamt gesehen wurde eine besonders starke Expression in Bereichen gefunden, in denen aktiv-sezernierende Laktozyten kuboidale oder Säulenform aufwiesen und die typische apokrine und ekkrine Sekretionsaktivität zeigten. Keine Expression wiesen intramammäre Leukozyten, Myoepithelzellen, Fibroblasten und Zellen des Gefäßsystems (Endothelzellen; Perizyten; glatte Muskelzellen) auf.

Somit konnte mit den verschiedenen Untersuchungsmethoden gezeigt werden, dass bei allen drei untersuchten Wiederkäuerarten PrP^C im Eutergewebe in artspezifischer und individuell verschiedener Intensität exprimiert wird. Auf die vor allem beim Rind erhaltenen, je nach angewandter Methode widersprüchlichen Ergebnisse wird in der Diskussion eingegangen.

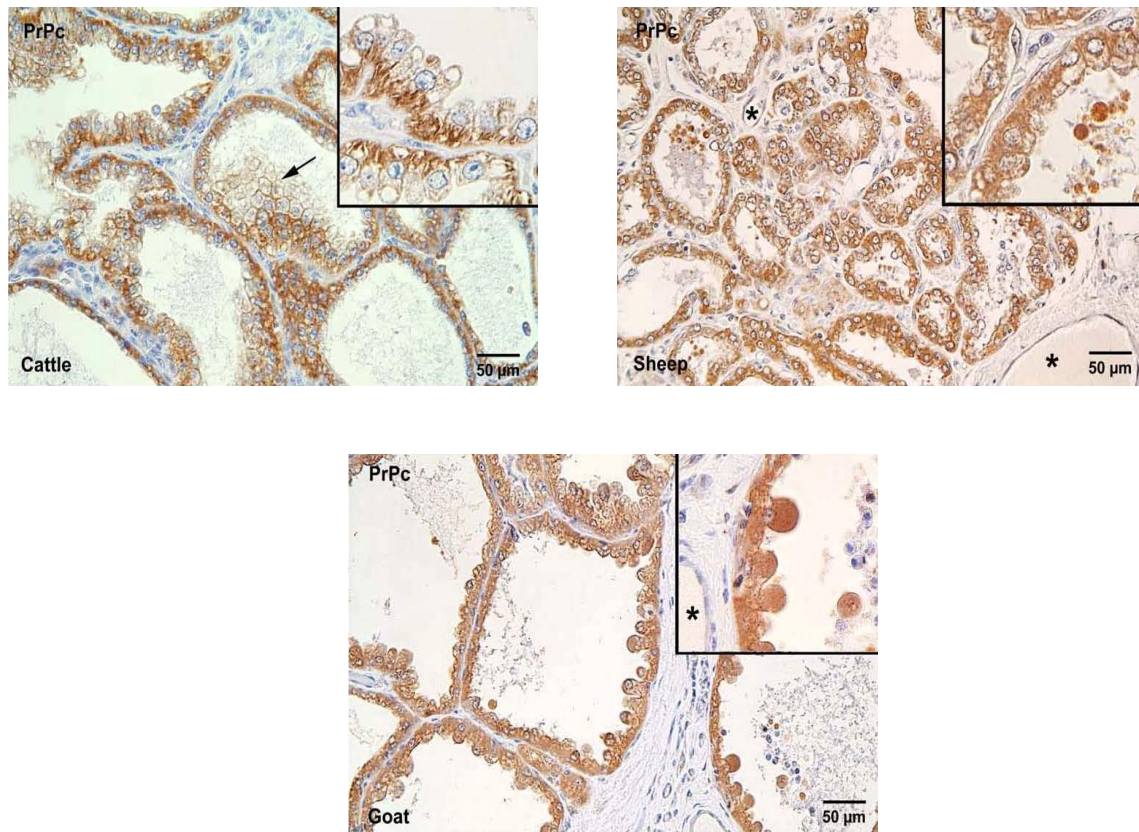


Abbildung 8: Immunhistochemische Lokalisation von PrP^C im Eutergewebe von Rind (oben links), Schaf (oben rechts) und Ziege (unten) während der Laktation.

Die Selektivfärbung zeigte sich in Epithelzellen (Laktozyten), die die tubuloalveolären Drüsenendstücke auskleiden. Die größte Farbintensität wiesen beim Rind aktive Säulenzellen und kuboide Zellen auf, flache Epithelzellen waren kaum gefärbt. Kleines Bild oben: Am meisten weisen die basolateralen Bereiche des Zytoplasmas die spezifische Färbung auf. Beim Schaf umfasste die positive Immunreaktion das ganze Zytoplasma. Endothelzellen (Sterne im Gefäßlumen), myoepitheliale Zellen und Fibroblasten wiesen keine PrP^C-spezifische Färbung auf. In der Vergrößerung zeigten sich PrP^C-haltige Partikel im Alveolarlumen.

Bei der Ziege war das komplette Zytoplasma homogen PrP^C-positiv gefärbt. Es zeigte sich deutlich die Abschnürung PrP^C-haltiger Sekretvesikel im Rahmen der apokrinen Sekretion ins Lumen (siehe auch Ausschnittvergrößerung). Weder die Leukozyten (Bildausschnitt) im Alveolarlumen noch die Zellen des Gefäßsystems (Stern im Gefäßlumen) wiesen PrP^C-spezifische Färbung auf.

4.1.2 PrP^C- Gehalte in der Milch

4.1.2.1 Spezies-spezifisches Vorkommen von PrP^C in Milchfraktionen der Hauswiederkäuer

Es wurden bei allen drei Tierarten die Milchfraktionen Rahm, Magermilch, Molke, Kasein und Zellen untersucht. Da die fetthaltige Matrix Rahm nicht direkt in die immunchemische Analytik eingesetzt werden konnte und zunächst eine Methodenetablierung nötig war, werden diese Ergebnisse in einem gesonderten Kapitel beschrieben.

Auch Kasein erwies sich trotz unterschiedlicher Aufarbeitungen (siehe 3.4.2) als schwierig zu analysierendes Material. Am besten für die Löslichkeit erwiesen sich die Varianten mit Lösen in 1 ml PBS und anschließender Neutralisation oder die Lösung in 1 M Harnstoff und Neutralisation (siehe Tab. 9). Allerdings war es lediglich beim Schaf möglich, PrP^C in der Kaseinfraktion mittels EIA nachzuweisen.

Da sich die folgenden Kapitel nicht nur auf die verschiedenen Tierarten sondern auch auf die unterschiedlichen Milchfraktionen beziehen, werden die Ergebnisse im Folgenden nach Tierarten getrennt dargestellt, wobei jeweils die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden nacheinander besprochen werden. Zusätzlich zu einer Übersichtstabelle für die jeweilige Tierart werden die Ergebnisse exemplarisch in Abbildungen gezeigt.

4.1.2.2 Vorkommen von PrP^C in Milchfraktionen des Rindes

In keiner der Milchfraktionen von Kühen ließ sich PrP^C mittels Sandwich-EIA bzw. Western-Blot detektieren (Tabelle 11 sowie Abb. 9 und 10).

Tabelle 11: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse für die verschiedenen Kuhmilchfraktionen

	Rind (n positiv / n untersucht)			
Methode	Magermilch	Molke	Zellen	Kasein
EIA	0/5	0/5	0/5	n. d.
WB	0/5	0/5	0/5	n. d.

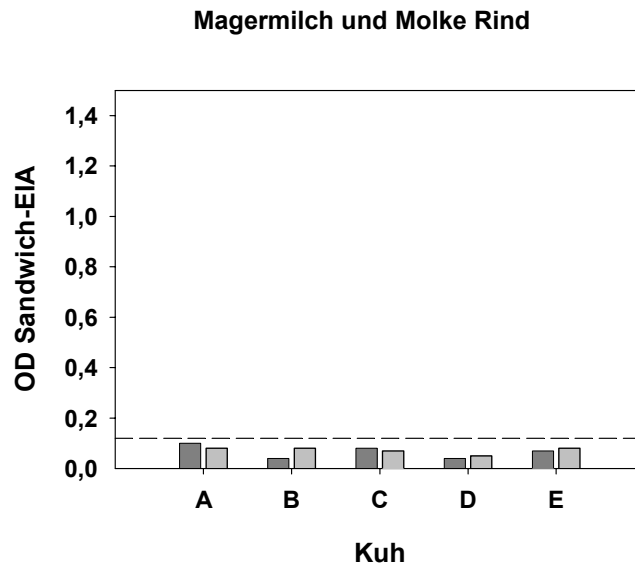


Abbildung 9: PrP^C- Gehalte in Kuhmilchfraktionen

Magermilch: dunkelgraue Balken; *Molke*: hellgraue Balken. Die Werte lagen allesamt unter dem Cut-Off von 0,12. Die untersuchten Tiere sind nicht identisch mit den Rindern aus der Untersuchung von Eutergewebe.

Der im EIA nicht nachweisbare PrP^C-Gehalt konnte für alle untersuchten Milchfraktionen des Rindes mittels Western-Blot bestätigt werden. Ein typisches Blotting-Ergebnis stellt – exemplarisch für Magermilch die Abbildung 10 dar. Die Ergebnisse für Molke und somatische Zellen waren identisch (nicht dargestellt).

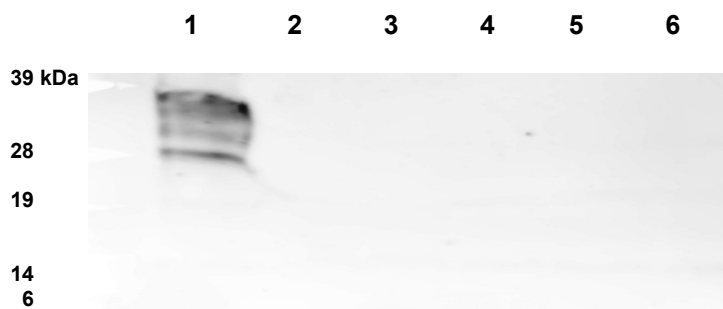


Abbildung 10: Western-Blot der Magermilch von Rindern

Spur 1: *Medulla oblongata* Kalb; Spur 2-6: Magermilch von fünf verschiedenen Kühen

4.1.2.3 Vorkommen von PrP^C in Milchfraktionen des Schafes

Acht Schafe wurden zweimal in Abstand von vier Wochen während der Laktation untersucht. Die Zusammenfassung aller Ergebnisse ist wiederum tabellarisch dargestellt (Tab. 12).

Tabelle 12: Übersicht zu den Untersuchungsergebnissen in verschiedenen Schafmilchfraktionen

Methode	Schaf (n positiv / n untersucht)			
	Magermilch	Molke	Zellen	Kasein
EIA	8/8	8/8	6/8	3/8
WB	7/7	8/8	0/8*	n. d.

* Die Detektion der PrP^C-Expression in der Zellfraktion war bei 7/8 Schafen im WB negativ, bei einem Tier fraglich. Bei dem während einer ganzen Lakationsperiode untersuchten Schaf 5 (s. 4.1.3) allerdings war in der darauffolgenden Laktation bei einigen Abnahmewochen die PrP^C-Expression in der Zellfraktion im WB mit mAk P4 nachweisbar.

Es zeigte sich ein deutlicher PrP^C-Gehalt in Magermilch und Molke (Abb. 11), der individuelle Unterschiede aufweist. Vor allem in den unverdünnten Proben der ersten Abnahme lagen die Werte deutlich außerhalb des linearen Meßbereichs des EIAs. So reichte die Extinktion bis zu 3,8 in der Molke bei einem Tier. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten aus der ersten und zweiten Abnahme sind in Abb. 11 jeweils die Ergebnisse der unverdünnten Proben dargestellt. In Tab. 13 sind die EIA-Ergebnisse in einer Verdünnung beschrieben, bei der der lineare Messbereich des Tests erreicht wurde. Zudem enthält die Tabelle eine deskriptive Analyse der Daten. Das Kasein wies beim Schaf PrP^C auf. Im EIA reagierte es unverdünnt bei vier von acht Tieren positiv. Seine Aufarbeitung hierzu war nach der Variante Lösen in 1000 µl PBS und anschließender Neutralisation erfolgt (s. 3.4.2). Im Western-Blot jedoch konnte kein PrP^C in der Kaseinfraktion detektiert werden.

Beim Schaf lag der PrP^C-Gehalt der unverdünnten somatischen Zellen (Abb. 11) bei sechs Tieren über dem Cut-Off-Wert, bei drei Tieren wurde der Wert sogar um ein Vielfaches überschritten. So waren in dieser Milchfraktion starke individuelle Unterschiede ersichtlich.

Tabelle 13: Extinktion im EIA im linearen Messbereich bei 1:4 Verdünnung der Milchfraktionen von Schafen (Cut-Off: 0,09)

Milchfraktion	Abnahme	Maximum	Minimum	Mittelwert	Standardabweichung	Positiv
Magermilch	1	0,65	0,10	0,34	$\pm 0,24$	8/8
	2	0,18	0,04	0,10	$\pm 0,06$	4/8
Molke	1	1,11	0,24	0,58	$\pm 0,34$	8/8
	2	0,43	0,07	0,22	$\pm 0,13$	6/8
Zellen	1	0,12	0,05	0,07	$\pm 0,02$	1/8
	2	0,05	0,02	0,03	$\pm 0,01$	0/8
Kasein	1	0,18	0,04	0,09	$\pm 0,05$	3/8
	2	0,09	0,02	0,04	$\pm 0,02$	1/8

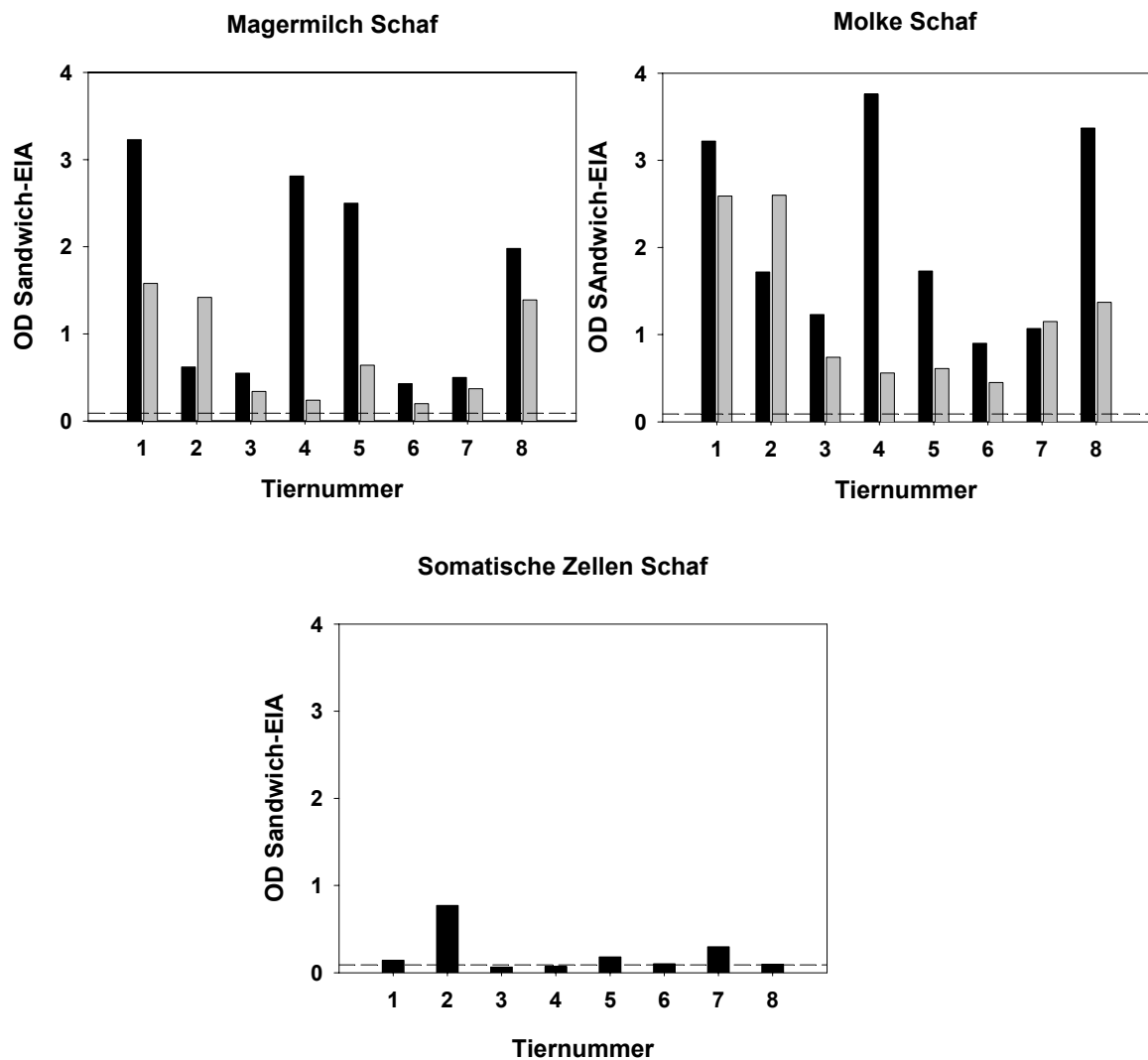


Abbildung 11 a-c: PrP^C-Gehalte in Milch von Schafen

Bei Magermilch (a) und Molke (b) wurden zwei Abnahmen berücksichtigt. Bei den Zellen (c) waren nur die Ergebnisse der 1. Abnahme auswertbar. Die Werte der ersten Abnahme sind mit schwarzen Balken dargestellt, die der zweiten mit hellgrauen. Der Cut-Off lag bei 0,09.

In Magermilch von Schafen wurde im Western-Blot zum einen das Volllängen-Prion-Protein sichtbar. Es dominierten die zweifach- und die unglykosilierte Form. Zum anderen zeigten sich zwei trunkierte Formen, von denen die bei ca. 8 kDa liegende die deutliche stärkere Bande bildete. PrP^C in Magermilch präsentierte sich im Western-Blot ähnlich wie das in der Molke vorhandene. In den somatischen Zellen der Schafmilch war die Darstellung von PrP^C mittels Western-Blot kaum möglich. Nur bei einem Tier zeigte sich das schattenhaft schwache Bandenmuster von PrP^C.

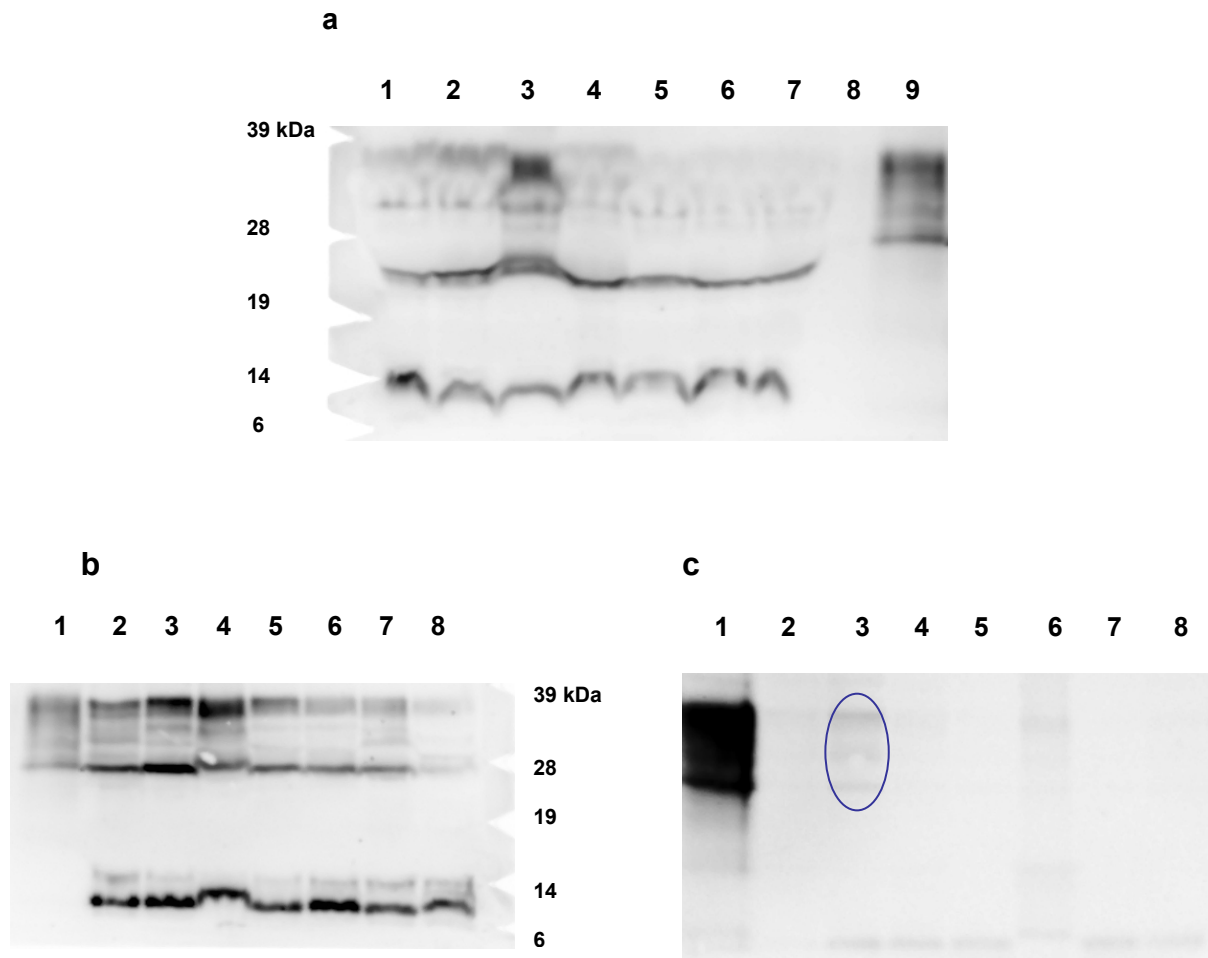


Abbildung 12 a, b und c: Western-Blot mit Magermilch (a), Molke (b) und somatischen Zellen (c) von Schafen

a = Spur 1-7: Magermilch von sieben verschiedenen Schafen; Spur 8: frei; Spur 9: *Medulla oblongata* Schaf. b und c = Spur 1: *Medulla oblongata* Schaf; Spur 2-8: Molke (a) bzw. somatische Zellen (b) von sieben Schafen. Das schattenhafte Bandenmuster ist in Blau eingekreist.

4.1.2.4 Vorkommen von PrP^C in Milchfraktionen der Ziege

In Ziegenmilch konnte bei den meisten Tieren PrP^C nachgewiesen werden (Tab. 14 und 15).

Tabelle 14: PrP^C-Vorkommen in den verschiedenen Milchfraktionen

	Ziege			
	(n positiv / n untersucht)			
Methode	Magermilch	Molke	Zellen	Kasein
EIA	10/20	17/20	6/20	n. d.
WB	20/20	20/20	13/20	n. d.

Allerdings lagen im EIA die PrP^C-Gehalte in Magermilch und Molke nur bei 10% derjenigen der Schafe, weshalb eine andere Skalierung gewählt wurde (Abb. 13 a-c). Während der Messwert bei Magermilch in der Hälfte der Fälle unter dem Cut-Off lag, war dies bei Molke nur bei drei von zwanzig Tieren der Fall. Doch auch wenn in der Magermilch oftmals niedrigere Werte ermittelt wurden, stimmt die Tendenz zwischen Magermilch und Molke zumeist überein. Nur gut ein Viertel der Ziegen zeigte im EIA PrP^C-Expression in den somatischen Zellen. Dies war weit weniger als beim Schaf.

Tabelle 15: PrP^C-Gehalte von Ziegenmilch im EIA

Milchfraktion	Maximum	Minimum	Mittelwert	Standardabweichung
Magermilch	0,37	0,05	0,15	± 0,09
Molke	0,33	0,04	0,18	± 0,09
Zellen	0,12	0,04	0,07	± 0,02

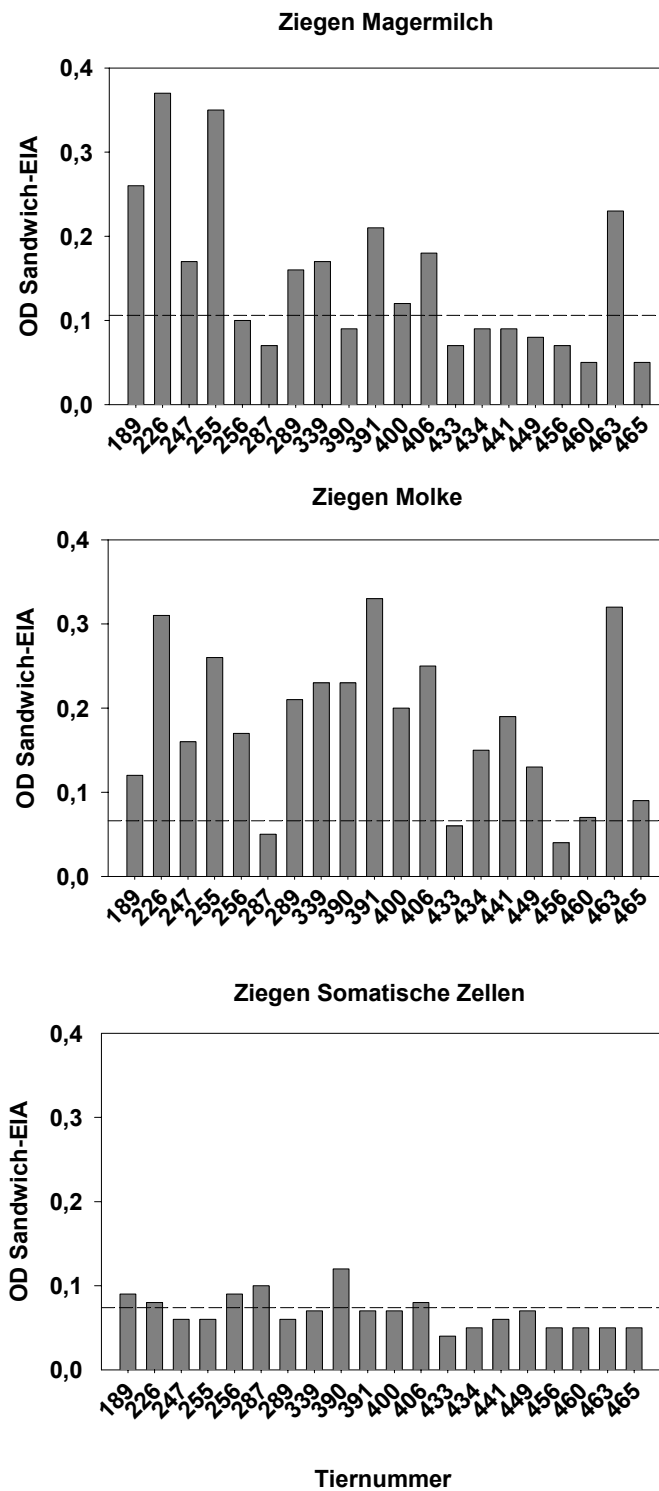


Abbildung 13: PrP^C-Gehalte in Milch von Ziegen

Bei den zwanzig untersuchten Ziegen zeigten sich individuelle Unterschiede im PrP^C-Gehalt in Magermilch (oben), Molke (Mitte) und Zellen (unten). Die gestrichelte Linie zeigt den Cut-Off Wert. Bei Magermilch lagen 10, bei Molke 17 Tiere mit dem PrP^C- Gehalt über diesem Wert. In den somatischen Zellen konnte bei sechs Tieren PrP^C nachgewiesen werden.

In der Magermilch und der Molke von Ziegen ließen sich die Ergebnisse des EIA ebenso wie beim Schaf mittels Western-Blot bestätigen. Die verschiedenen Fraktionen zeigten jedoch ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster (Abb. 14). Besonders auffällig war das dominierende Auftreten einer trunkierten Form bei 7 bzw. 14 kDa. Die Bande bei 7 kDa stellte in Molke die einzig deutlich detektierbare Form von PrP^C dar. Das für die unterschiedlichen Glykoformen typische Bandenmuster bei 19-39 kDa war nur als „schattenartige“ Struktur erkennbar. Anders verhielt es sich in der Magermilch. Hier waren zusätzlich zu der trunkierten Form auch die unglykosilierte und die einfach glykosilierte Form des zellulären Volllängen- Prion Protein erkennbar.

Die Western-Blots der Milchzellen von Ziegen zeigten im Gegensatz zu anderen Milchfraktionen bei einigen Tieren keine, bei anderen nur schwache, unscharfe Banden (Abb. 14), wodurch sich das Bild nur schwer interpretieren lässt. Vermutlich handelt es sich um die drei typischen Formen. Wesentlich deutlicher war die trunkierte Form bei 8 kDa zu erkennen.

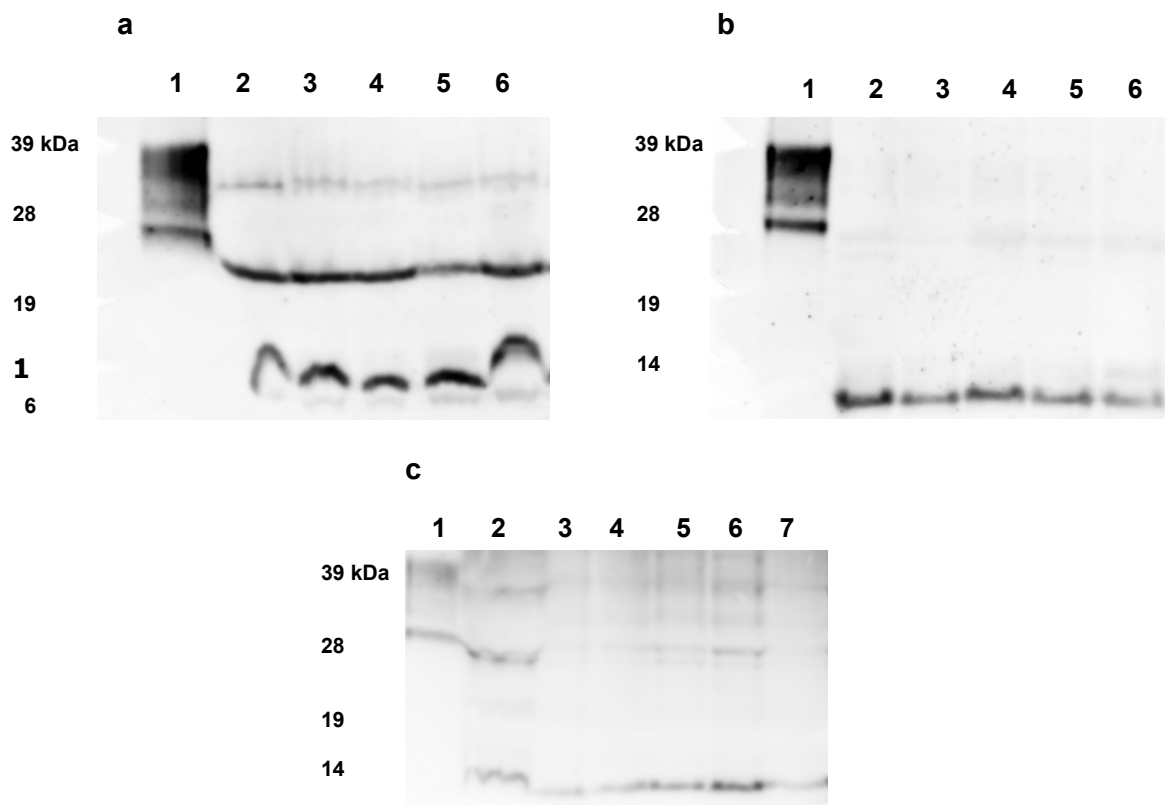


Abbildung 14 a-c: Magermilch (a), Molke (b) und somatische Zellen von Ziegen im Western-Blot.

Spur 1 = Medulla oblongata Kalb; Spur 2-6 bzw. 2-7= Magermilch/Molke/somatische Zellen von diversen Ziegen.

Die Ergebnisse zu PrP^C in Milch decken sich somit bei beiden Untersuchungsmethoden: Weder mit Western-Blot noch mit EIA konnte beim Rind PrP^C in der Milch nachgewiesen werden. Das Schaf zeigte im EIA relativ hohe PrP^C-Gehalte und im Western-Blot von Molke waren die Volllängen-Isoformen und die trunkierten Formen gut darstellbar. Die Ziege hingegen zeigte darin nur eine trunkierte Formen bei ca. 8 kDa klar und die PrP^C-Gehalte im EIA entsprachen nur 10% der des Schafes.

4.1.3 PrP^C-Gehalte im Laktationsverlauf beim Schaf

Der Versuch an acht Schafen, die zweimal innerhalb von vier Wochen beprobt wurden, hatte wie oben gezeigt ergeben, dass die PrP^C-Gehalte in den Milchfraktionen in der späteren Laktationsphase niedriger waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass PrP^C im Rahmen des Laktationsgeschehens reguliert sein könnte. Aus diesem Grund wurde eines der Schafe (Schaf 5) in der folgenden Laktationsperiode kontinuierlich im Wochenabstand beprobt. Die Laktation erstreckte sich über einem Gesamtzeitraum von 31 Wochen. Magermilch, Molke und Zellen wurden wiederum mittels EIA und Western-Blot analysiert. Die Ergebnisse des EIAs sind in Abb. 15 dargestellt. Es zeigt sich eine Regulation der PrP^C-Sekretion über die Laktation mit einem deutlichen Peak im mittleren Drittel.

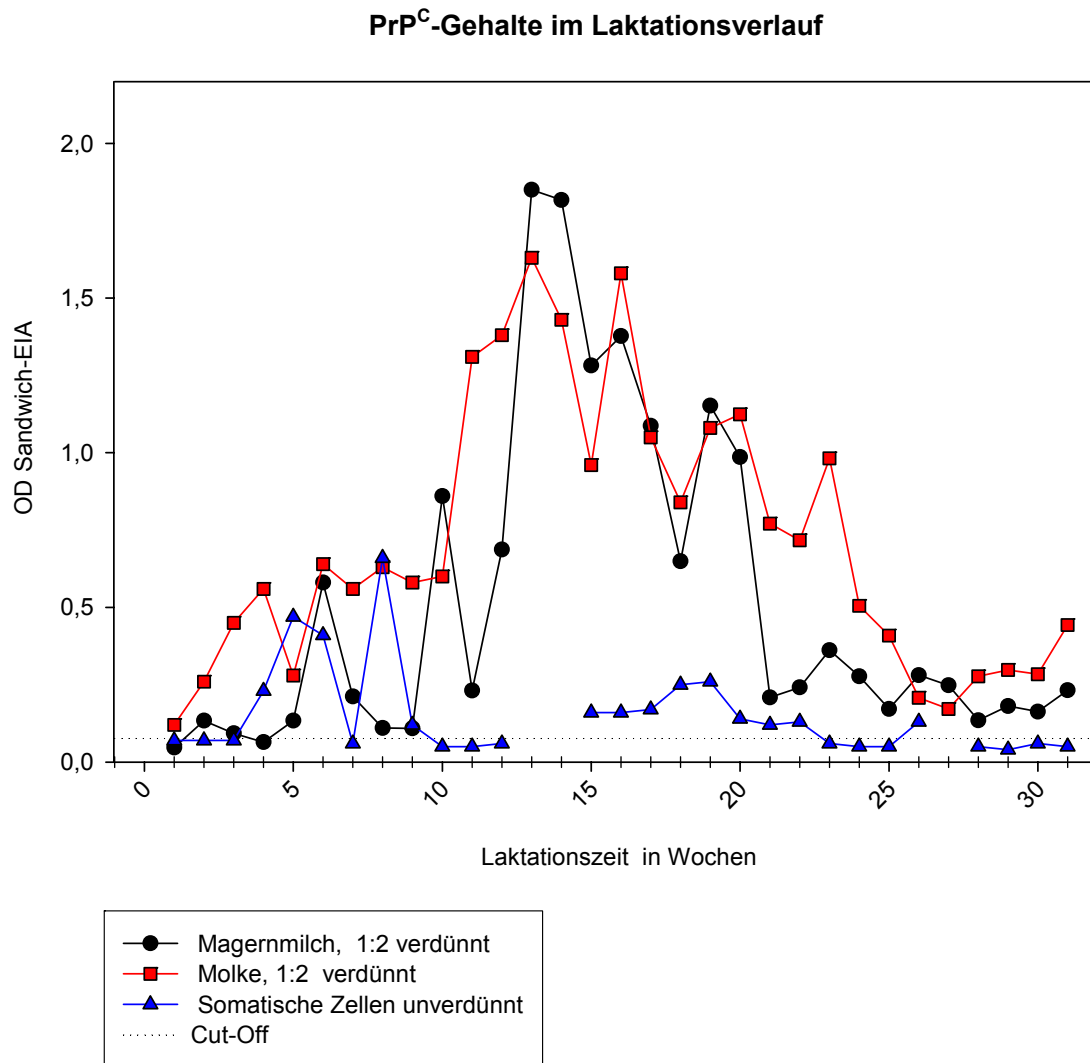


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Analysenwerte verschiedener Milchfraktionen im Laktationsverlauf bei einem Schaf

Es ist der PrP^C-Gehalt in Magermilch, Molke und somatischen Zellen der Milch im Laktationsverlauf dargestellt. Der durchschnittliche Cut-Off der einzelnen Messungen lag bei 0,08.

Ein PrP^C-Nachweis in unterschiedlicher Höhe war bei Magermilch und Molke in allen Laktationsstadien, in den somatischen Zellen der Milch nur manchmal gegeben. Bei Molke (rote Kurve in Abb. 15) stieg der PrP^C-Gehalt in den ersten Wochen an, blieb von Woche drei bis zehn auf einer einheitlichen Extinktion um 0,5. Danach erfolgte ein rapider Anstieg bis auf das Dreifache. Auf diesem Level von ca. 1,5 blieb die Extinktion für einige Wochen in der Mitte der Laktation und fiel mit Schwankungen auf 1,0 und langsam weiter ein Niveau von 0,3 ab, auf dem sie bis zum Ende der Laktation blieb.

Einen ähnlichen, allerdings stärker fluktuierenden Verlauf zeigte auch der PrP^C-Gehalt in Magermilch. In dieser Fraktion wurden OD-Werte um 1,0 früher erreicht und das hohe

Niveau zu Mitte der Laktation drei Wochen früher verlassen. Bei Magermilch und Molke wurden somit die höchsten Werte im mittleren Drittel der Laktation gemessen.

Bei den somatischen Zellen fanden sich zu manchen Abnahmezeitpunkten im Laktationsverlauf positive Werte. Gerade im ersten Drittel der Laktation sind vereinzelt Werte deutlich über dem Cut-Off. Eine Korrelation zur Zellzahl konnte dabei nicht festgestellt werden.

Im Western-Blot von Molke mit einer Auswahl der wöchentlichen Abnahmen über den gesamten Laktationszeitraum (Abb. 16) sind die Banden zu Mitte der Laktationsperiode etwas intensiver gefärbt als zu Beginn und zum Ende. Dies steht in guter Korrelation zum Sandwich-EIA. Wie schon bei der Einzelanalyse der acht Tiere, ist die trunkierte Form auf Höhe von 8 kDa die mit Abstand die stärkste Bande, gefolgt von un- und zweifach glykosylierter Form.

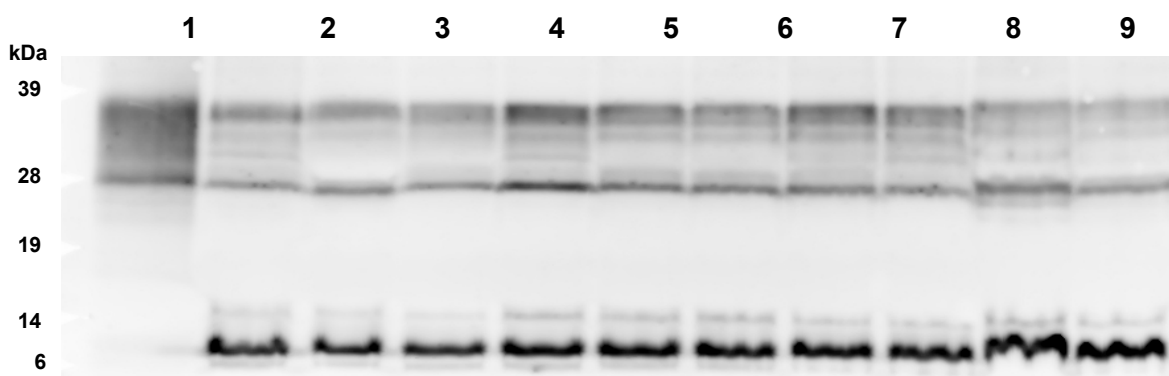


Abbildung 16: Western-Blot mit Molke vom Schaf über eine Laktationsperiode hinweg

Spur 1: Schaf- Homogenat aus *Medulla oblongata*, 1:20 verdünnt; Spur 2 -11: Molke von einem Schaf, Auswahl aus der Laktationsperiode von 31 Wochen; Spur 2: Woche 2, Spur 3: Woche 4, Spur 4: Woche 9, Spur 5: Woche 11, Spur 6: Woche 15, Spur 7: Woche 18, Spur 8: Woche 21, Spur 9: Woche 23, Spur 10: Woche 26, Spur 11: Woche 31. Zu allen Zeitpunkten der Laktation sind drei Isoformen von PrP^C deutlich erkennbar.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den acht Schafen in der vorherigen Laktation im Western-Blot (s. 4.1.2.3, Abb. 11c) zeigte Schaf 5 in dieser Laktation je nach Abnahmewoche deutliche PrP^C-Banden im Western-Blot (Abb. 17).

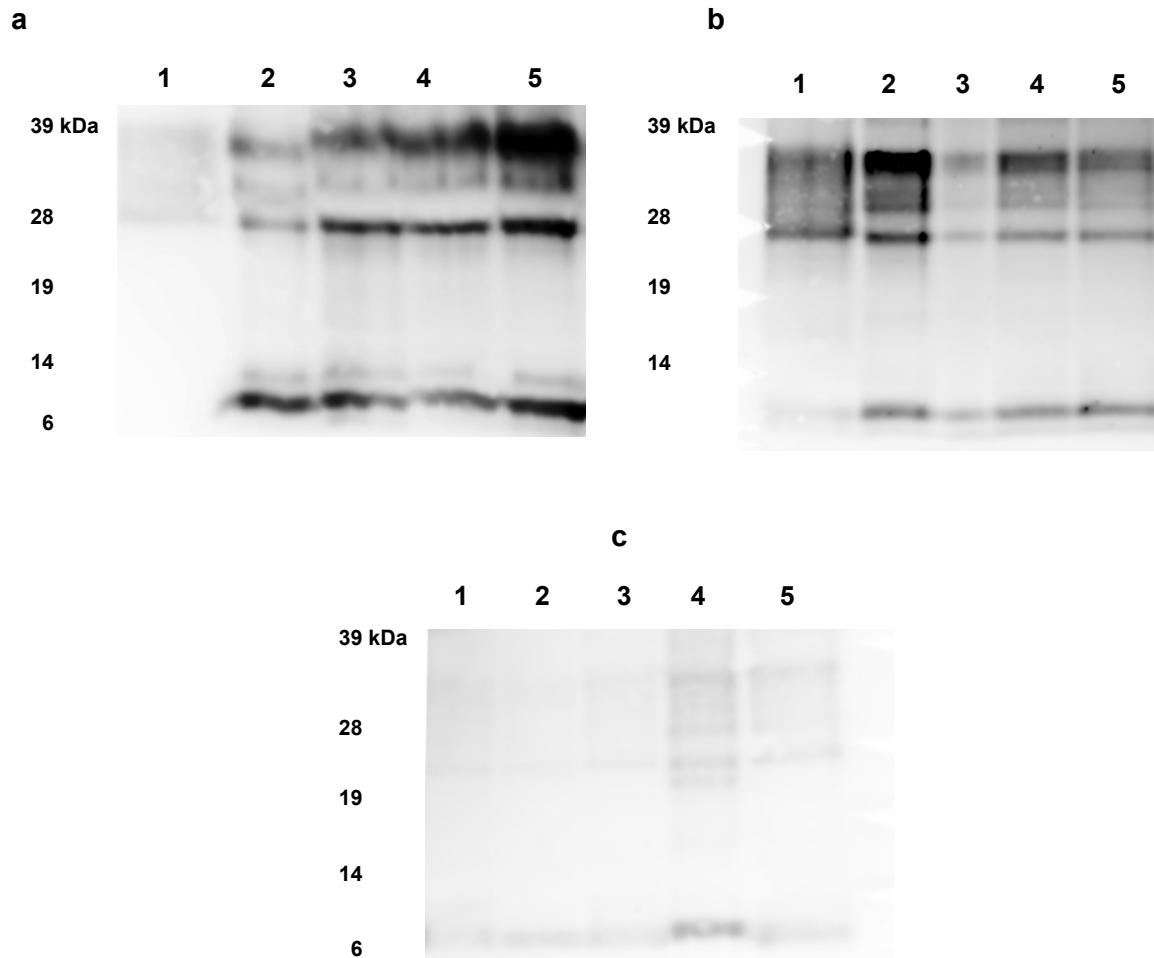


Abbildung 17: PrP^C-Expression in den somatischen Zellen der Milch von einem Schaf zu bestimmten Abnahmewochen während der Laktation: a) Frühlaktation, b) Hochlaktation c) Spätlaktation

a) Spur 1: Schaf *Medulla oblongata*; Spur 2-5: Woche 1-4; b) Spur 1: Schaf *Medulla oblongata*; Spur 2-5: Woche 13, 15, 16 17; c) Spur 1-5: Woche 23-26, 28

Vor allem in den ersten Wochen der Laktation (a) und im mittleren Drittel der Laktation (b) konnte PrP^C nachgewiesen werden. Gegen Ende der Laktation (c) hingegen war PrP^C zumeist nur schattenhaft erkennbar. Allerdings gab es auch innerhalb der einzelnen Laktationsabschnitte deutliche Schwankungen im Hinblick auf die Bandenintensität (b: Spur 3, c: Spur 4). Die Bandenstärke im Western-Blot und die Höhe der Extinktion im EIA korrelieren jedoch gut.

4.2 Etablierung eines Aufarbeitungsverfahrens für Proteine aus der Rahmfraktion

Da der Einsatz von immunchemischen Methoden wie EIA und Western-Blot nur im wässrigen Milieu möglich ist, erforderte die Aufarbeitung des fettreichen Rahms einen abweichenden methodischen Ansatz. Ziel dieses Ansatzes war es, den im Rahm enthaltenen Proteinanteil in ein wässriges Milieu zu überführen und gleichzeitig eine optimale Löslichkeit des Proteinpellets sicherzustellen. Diese ist Voraussetzung für einen korrekten PK-Verdau und eine Detektion im Western-Blot. Die Ergebnisse dieser Methodenetablierung (siehe 3.4.3) sind im Folgenden dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass nach der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Trennung in der anorganischen Phase kein PrP^c im Western-Blot nachweisbar war. Wurde das gefällte Protein der organischen Phase allein verwendet, zeigten sich im Vergleich zu den Ansätzen, in denen die Interphase mit in die Proteinfällung eingegangen war, starke Proteinverluste. Dies wurde besonders deutlich, wenn Rahm aus Kolostrum aufgearbeitet wurde. Abb. 18 enthält die vergleichenden Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Proteingewinnung aus Rahm.

Zudem zeigten die verschiedenen Modifikationen der Proteinfällung durch Zugabe von EDTA keine Verbesserung der Blotting-Ergebnisse. Eine vollständige homogene Suspension des erhaltenen Proteinpellets konnte mit allen getesteten Methoden nicht hergestellt werden, was sich nachteilig auf die Wiederholbarkeit der Blotting-Ergebnisse auswirkte. So führte das Einbringen von gelösten Proteinpellets auf die Detektionsplatte des PrionScreen® zu einem positiven Ergebnis bei den Negativkontrollen und allen untersuchten Proben, da kein vollständiger PK-Verdau erfolgte. Einzig eine Homogenisierung auf der PrionScreen®-Homogenisierungsplatte brachte eine gleichmäßige Suspension.

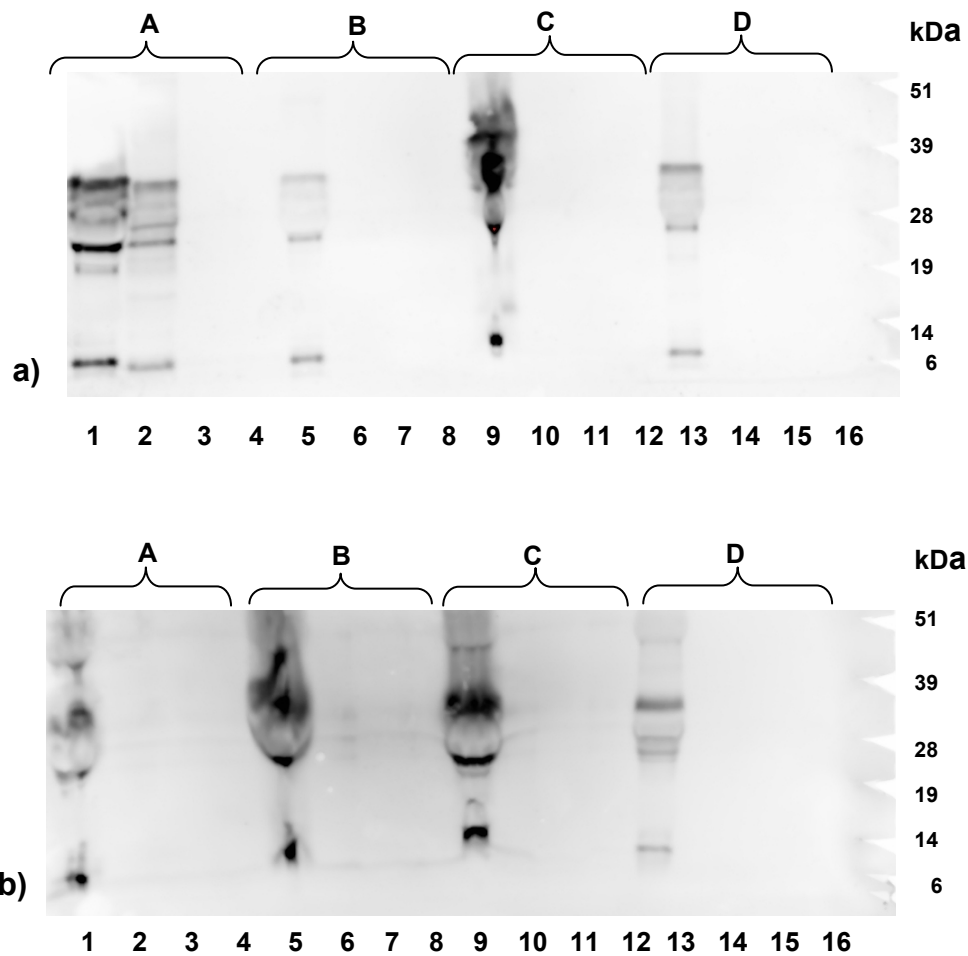


Abbildung 18 a+b: Aufarbeitungsvarianten für Rahm aus Milch (a) und Kolostrum (b)

Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.4.3 beschrieben. Die Abwandlungen sind vermerkt. Variante A (Spur 1-4): Proteinfällung mit 5 mM EDTA/ 90% Isopropanol und Zugabe von 20 mM EDTA nach dem PK-Verdau; Variante B (Spur 5-8): Zugabe von 20 mM EDTA nach dem PK-Verdau; Variante C (Spur 9-12): entspricht der Version, die aufgrund der guten Bandenqualität zur Untersuchung der Proben verwendet wurde. Variante D (Spur 13-16): nur mit organischer Phase weitergearbeitet; Zugabe von 20 mM EDTA nach dem PK-Verdau; Spuren 1,5,9 + 13: kein PK-Verdau erfolgt; Spuren 2,6,10 + 14: 10 min Inkubationszeit für die PK; Spuren 3, 7, 11+ 15: 20 min Inkubationszeit für die PK; Spuren 4, 8, 12 + 16: 30 min Inkubationszeit für die PK.

4.2.1 Tierartlich-vergleichendes Vorkommen von PrP^C im Rahm

Nun soll kurz das Vorkommen von PrP^C-Expression im Rahm der drei Hauswiederkäuer (Abb. 19) erläutert werden. Im Rahm der Rinder war mit der neu-etablierten Methode kein PrP^C nachweisbar. Im Rahm des Schafes hingegen zeigten sich alle bereits aus anderen

Milchfraktionen bekannten Banden. Gleiches gilt für die Ziege, wobei sich die jeweilige Bandenstärke unterschied.

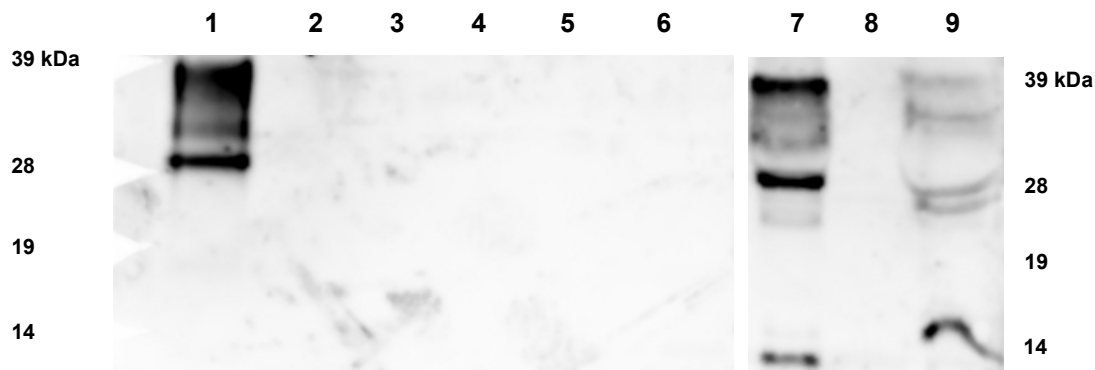


Abbildung 19: PrP^C-Expression im Rahm von Rind, Schaf und Ziege

Spur 1: Kalb 4 *Medulla oblongata* 1:4; Spur 2-6: Rahm von Kuh 1-5; Spur 7: Rahm Schaf 5; Spur 8: Rahm von vier Ziegen gepoolt mit PK; Spur 9: Rahm von vier Ziegen gepoolt ohne PK. Die Aufarbeitung des Rahms erfolgte wie unter 3.4.3 beschrieben.

4.3 Untersuchung auf PrP^{res} in Eutergewebe und Milch bei TSE-infizierten Rindern und Schafen

4.3.1 Ergebnisse bei BSE-infizierten Rindern

Bei der Aufarbeitung des Eutergewebes wurden im Hinblick auf die von PrP^C abweichenden Eigenschaften der pathologischen Isoform des Prion Proteins verschiedene Varianten zur Aufarbeitung getestet (siehe 3.4.1 Tab. 8). Zur besseren Übersicht der Western-Blot-Ergebnisse werden in Abb. 20 a und b nur die Abkürzungen für die jeweilige Aufarbeitung verwendet.

Beim Entwickeln der Membran mit mAk P4 zeigten sich zunächst scheinbar „schattenhafte“ Banden, bei einem Molekulargewicht, bei den man PrP^{res} vermuten könnten (Abb. 23 a). Da diese Banden jedoch äußerst schwach waren, wurde zur Kontrolle ein unspezifischer Primärantikörper eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass alle aufgetretenen Banden im Eutergewebe unspezifisch waren (Abb. 23 b).

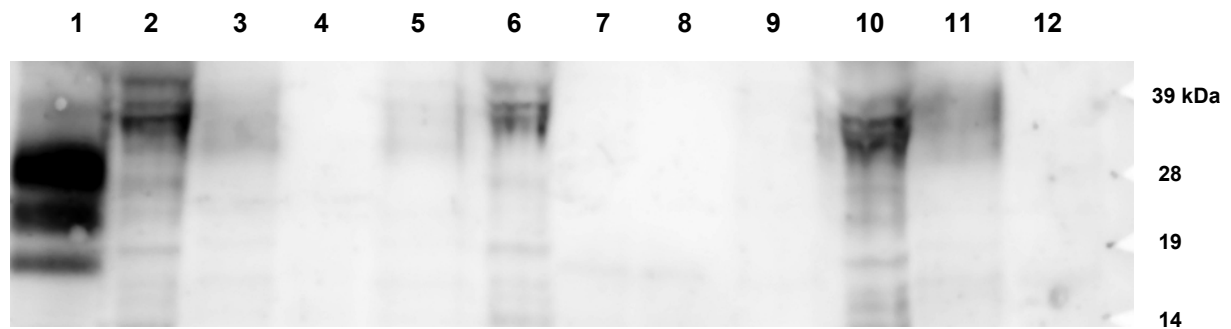


Abbildung 20a: Western-Blot des Eutergewebes der drei BSE-Kühe mit Primärantikörper P4

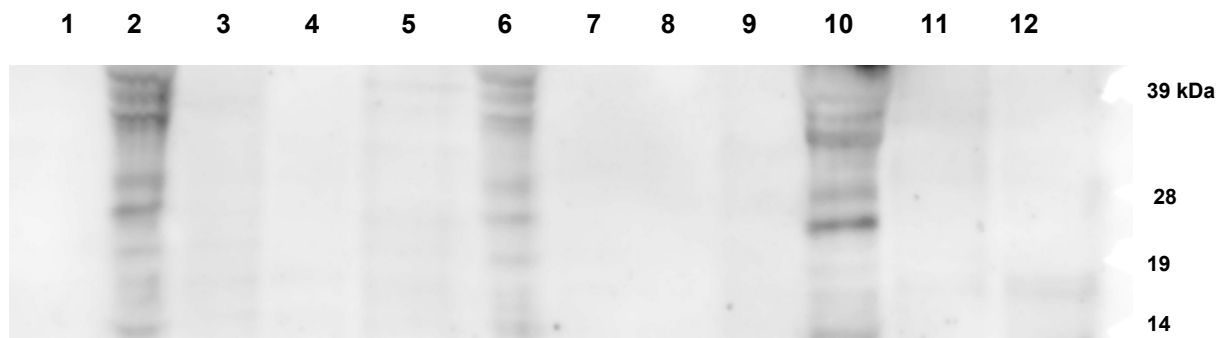


Abbildung 20b: Western-Blot des Eutergewebes der drei BSE-Kühe mit unspezifischem Primärantikörper stx 7H11

Abbildung 20 a+b: Spur 1: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata* mit PK; Spur 2-5: BSE-Kuh PG 113/01 Variante a1) - c); Spur 6-9: BSE-Kuh PG 0049/02 Variante a1) - c); Spur 10-12: BSE-Kuh PG 0050/02 Variante a1) - b). Beide AK wurden in einer Konzentration von 7,5 µg/ml eingesetzt.

Auch in der immunhistochemischen Untersuchung des Eutergewebes fand sich bei keiner der drei Kühe PrP^{res}. Exemplarisch sind in Abb. 21 Immunhistochemie-Bilder einer der Kühe abgebildet.

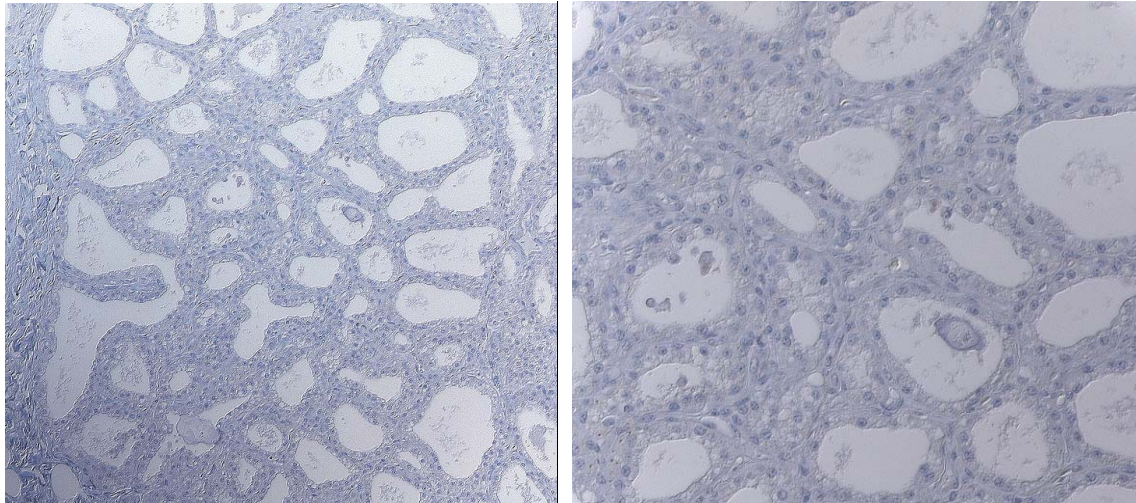


Abbildung 21: Immunhistochemische Abbildung des Eutergewebes der BSE-Kuh PG 113/01

Die Vorgehensweise erfolgte wie in 3.3.10 beschrieben. Weder in der 10 fachen (links) noch in der 20 fachen Vergrößerung (rechts) war PrP^{res} erkennbar.

In Magermilch, Molke und Kasein dieser drei BSE-Kühe sowie der Färsen aus dem FLI war ebenfalls kein PrP^{res} im hauseigenen Western-Blot nachweisbar. Es zeigten sich wiederum nur unspezifische Banden. Rahm stand von den Tieren nicht zur Verfügung.

Die vorhandenen Materialien der BSE-Kühe bzw. der Färsen wurden in den in Tab. 16 angegebenen Verhältnissen zusätzlich im PrionScreen® eingesetzt.

Tabelle 16: Verhältnis des eingesetzten Materials zur Homogenisierungslösung des PrionScreen®

Material	Menge Material	Menge der Homogenisierungslösung des PrionScreen®
Eutergewebe	150 mg	900 µl
Kasein	500 mg	600 µl
Magermilch	500 µl	500 µl
Molke	500 µl	500 µl
Zellen	500 µl	500 µl

Der Einsatz im PrionScreen® erbrachte die in Abb. 22 dargestellten Ergebnisse. Das Eutergewebe der drei BSE-Kühe, Magermilch und Molke aller vier Rinder sowie die Zellen des milchartigen Sekrets der Färsen waren negativ. Die Kaseinfraction aller vier Tiere allerdings reagierte positiv im PrionScreen®-EIA, wobei eine unspezifische Reaktion nicht ausgeschlossen werden konnte.

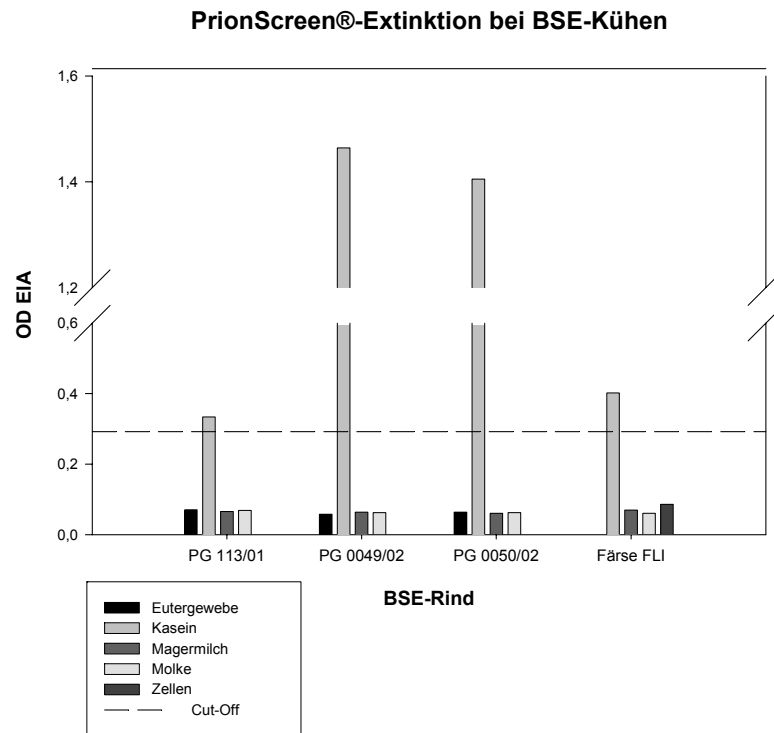


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Analysenwerte des Eutergewebes und verschiedener Milchfraktionen bei BSE-infizierten Rindern im PrionScreen®

4.3.2 Ergebnisse in Milch von TSE-infizierten Schafen mittels der neu-etablierten Aufarbeitung

Die Abbildung 23 a-d zeigt, dass in Molke, die aus Milch gewonnen wurde keine Anzeichen auf das Vorkommen von PrP^{res} vorliegen. Lediglich die trunkierte Form des Prion Protein scheint eine höhere PK-Resistenz aufzuweisen als die Volllängen-Variante. Im Rahm, der aus Milch gewonnen wurde, blieben nach PK-Verdau Banden sichtbar, die auf der Höhe der einfach- bzw. unglykosilierten Form von PrP^C liegen. Ob es sich um PrP^C oder PrP^{res}, welches keine deutlichen Banden-Shift zeigt, handelt, konnte mit der im Institut etablierten Methode nicht entschieden werden. Ähnliche Beobachtungen wurden für Molke aus Kolostrum sowie Rahm aus Kolostrum gemacht, wobei in der Molkefraktion vor allem die PK-Resistenz der trunkierten Form hervorstach. Im Rahm hingegen dominierten die Banden, welche nach PK-Verdau auf der Höhe von PrP^C stehen blieben.

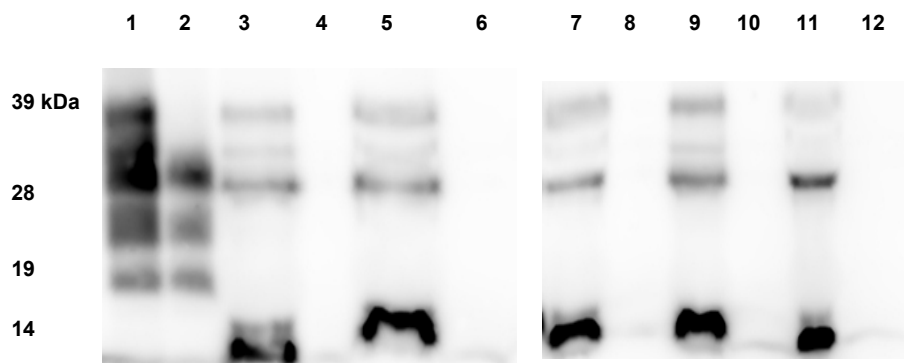


Abbildung 23a: Molke aus Milch TSE-infizierter Tiere

Spur 1: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata*; Spur 2: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata* +PK; Spur 3-6: Molke BSE-infizierter Schafe; Spur 7-12: Molke Scrapie-infizierter Schafe -/+PK; geradzahlige Spuren ohne PK, ungeradzahlige mit PK

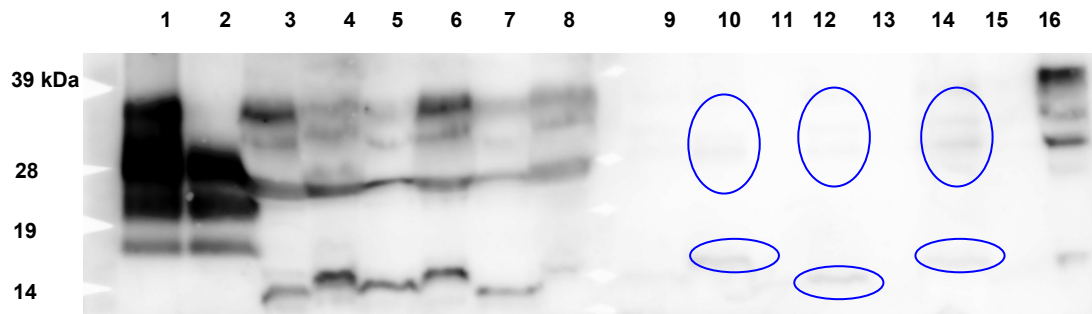


Abbildung 23b: Rahm aus Milch TSE-infizierter Tiere

Spur 1: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata*; Spur 2: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata* +PK; Spur 3-8: Rahm BSE- bzw. Scrapie-infizierter Schafe ohne PK; Spur: 9-14: Rahm BSE- bzw. Scrapie-infizierter Schafe mit PK; Spur 15: Rahm eines negativen Kontrollschafs mit PK; Spur 16: Rahm eines negativen Kontrollschafs ohne PK. Schattenhafte Banden wurden mit Ovalen markiert.

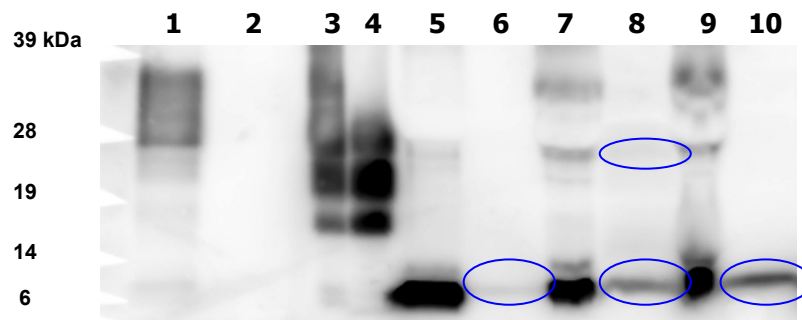


Abbildung 23c: Molke aus Kolostrum TSE-infizierter Schafe

Spur 1: Schaf *Medulla oblongata*; Spur 2: Schaf *Medulla oblongata* + PK; Spur 3: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata*; Spur 4: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata* +PK; Spur 5,7,9: Molke BSE-infizierter Tiere ohne PK; Spur 6,8,10: Molke BSE-infizierter Schafe +PK. Schattenhafte Banden wurden mit Ovalen markiert.

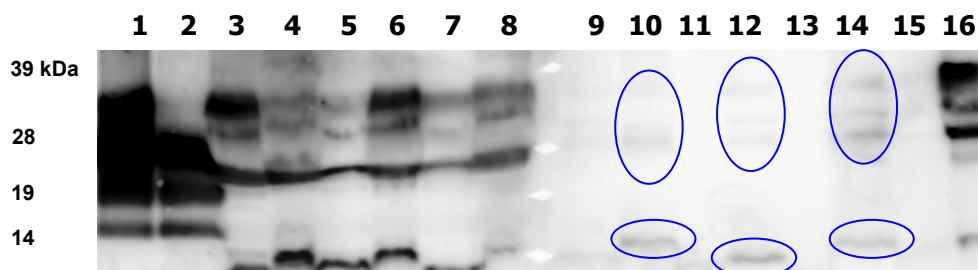


Abbildung 23d: Rahm aus Kolostrum TSE-infizierter Schafe

Spur 1: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata*; Spur 2: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata* +PK; Spur 3-8: Rahm Scrapie- bzw. BSE-infizierter Schafe +PK; Spur 9-15: Rahm Scrapie- bzw. BSE-infizierter Schafe ohne PK; Rahm eines negativen Kontrollschafs ohne PK. Schattenhafte Banden wurden mit Ovalen markiert.

4.3.3 Ergebnisse in Milch von TSE-infizierten Schafen mittels Aufarbeitung im PrionScreen®

Nachdem mit der selbstetablierten Methode zur Milchaufarbeitung keine endgültige Klarheit über das Vorkommen von PrP^{res} in der Milch von TSE-infizierten Schafen gewonnen werden konnte, wurden Proben der Tiere, die sich in irgendeiner Form als PK-resistenter gezeigt hatten, mittels des PrionScreen®-Tests aufgearbeitet und untersucht.

Bei den VLA-Schafen sowohl der Scrapie- als auch der BSE-Gruppe wurden Proteinpellets aus Rahm von Milch oder Kolostrum im PrionScreen® untersucht. Dabei waren alle intern eingesetzten Negativkontrollen deutlich unter dem Cut-Off, die Positivkontrollen (Scrapie-Hirngewebe direkt im PrionScreen® eingesetzt sowie mit Scrapie-Hirn dotiertes Kolostrum nach Rahmaufarbeitung) reagierten positiv (Abb. 24). Die zu untersuchenden Rahmproben aus Milch waren negativ, insgesamt 16 Kolostrumproben aus den zwei verschiedenen Gruppen sowie die dotierten Kolostralproben reagierten positiv. (Abb. 24). Ein Überblick, wieviele der insgesamt untersuchbaren Proben positiv reagierten, ist Tab. 17 zu entnehmen. Bei den Kolostrumproben der BSE-Gruppe zeigten acht von 46 eine positive Reaktion. Der klinische Status der zugehörigen Tiere ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. 20). Bei den Schafen der Scrapie-Gruppe reagierten sieben von insgesamt 10 einsetzbaren Kolostralproben positiv. Alle diese Tiere waren auch infiziert, zeigten inzwischen bereits klinische Symptome, wurden geschlachtet und als Scrapie-positiv getestet (s. Tab. 19 im Anhang).

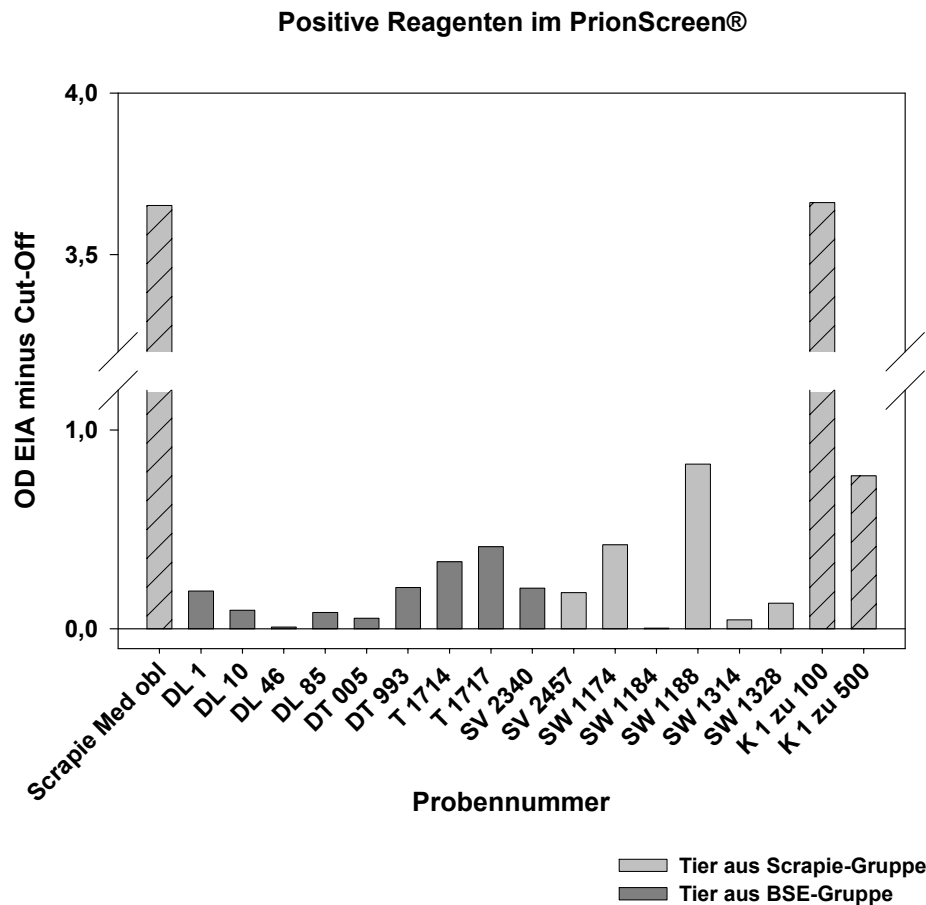


Abbildung 24: Positive Reagenten des PrionScreen®

Als Positivkontrollen dienten Medulla oblongata (Med. obl.) eines Scrapie-Schafes, das direkt in den PrionScreen® eingesetzt wurde, sowie mit Scrapie-Hirngewebe versetztes Kolostrum (im Verhältnis 1:100 und 1:500 dotiert), das die Rahmaufarbeitung durchlief. Alle Analysenwerte wurden um den Cut-Off bereinigt eingetragen. Einige Probenwerte lagen nur knapp über dem Cut-Off, die meisten jedoch überragen ihn deutlich. Bei allen positiven Reagenten handelte es sich um Kolostrumproben.

Tabelle 17: Ergebnisse der Milchproben von BSE- bzw. Scrapie-infizierten Schafen bei Einsatz des aufgearbeiteten Rahms im PrionScreen®

Kategorie	Eingesetzte Probenzahl (n)	untersuchtes Material: Proteinpellet des Rahms aus		Positive Ergebnisse im Prion Screen	
		Kolostrum	Vollmilch	Kolostrum	Vollmilch
Scrapie	13*	10	3	7	0
BSE	108**	46	62	8	0

* Die Kolostrumprobe eines Scrapie-Schafes sowie ** 9 Proben von BSE-Schafen (6 Vollmilchproben und 3 Kolostrumproben) konnten aus unterschiedlichen Gründen nicht im PrionScreen® untersucht werden.

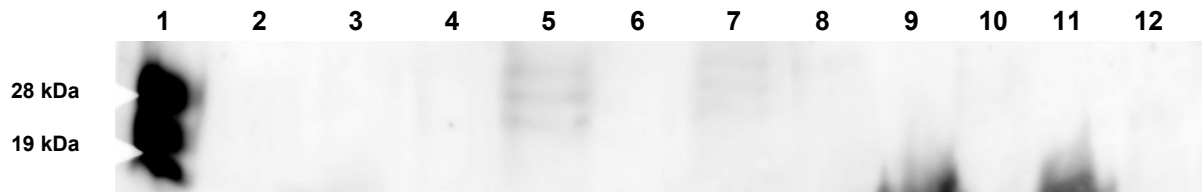


Abbildung 25: Western-Blot der Rahmfraction von BSE- bzw. Scrapie-infizierten Schafen

Das Pellet wurde in die PK enthaltende Homogenisierungslösung des PrionScreen® gegeben und ein Aliquot aus der Digestionsplatte des PrionScreen® wie unter 3.4.9 erklärt für den Western-Blot (s. 3.4.7) verwendet. Die Detektion erfolgte mit 7,5 µg/ml mAK P4 und ExtrAvidin 1:3000. Spur 1: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata* mit PK; Spur 2, 10: Rahm aus Vollmilch; Spur 3-9: Rahm aus Kolostrum; Spur 2: SSO 758; Spur 3: SSO 758; Spur 4: DT 992; Spur 5: T 1714; Spur 6: DL 112; Spur 7: SW 1188; Spur 8: SV 2457; Spur 9: SW 1328; Spur 10: SW 1184; Spur 11: Kolostrum von negativem Kontrollpool; Spur 12: Milch von negativem Kontrollpool; Spuren 2-6 Schafe aus BSE-Gruppe; Spuren 7-10 Schafe aus Scrapie-Gruppe. Die Proben in Spur 5, 7, 8 und 9 hatten im PrionScreen® positiv reagiert.

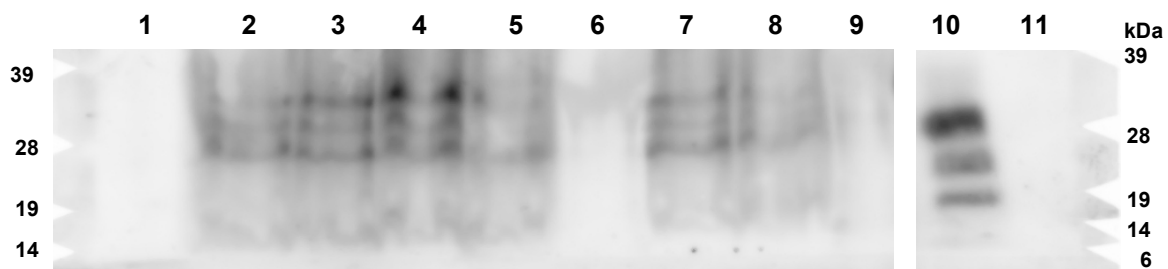


Abbildung 26: Western-Blot der Rahmfraction von BSE- bzw. Scrapie-infizierten Schafen

Das Pellet wurde in die PK enthaltende Homogenisierungslösung des PrionScreen® gegeben und ein Aliquot aus der Digestionsplatte des PrionScreen® wie unter 3.4.9 erklärt für den Western-Blot (s. 3.4.7) verwendet. Die Detektion erfolgte mit 7,5 µg/ml mAK P4 und ExtrAvidin 1:3000. Spur 1, 11: frei; Spur 2 bis 8: Rahmproben von VLA-Schafen, die im PrionScreen® positiv reagiert hatten; Spur 2: DT 993 Kolostrum; Spur 3: T 1714 Kolostrum; Spur 4: SW 1188 Kolostrum; Spur 5: SV 2457 Kolostrum; Spur 6: SW 1328 Kolostrum; Spur 7: SW 1184 Kolostrum; Spur 8: DL 10 Kolostrum; Spur 9: Kolostrum von negativem Kontrollpool; Spur 10: Scrapie-Schaf *Medulla oblongata* mit PK. Die Schafe DT 993, T 1714 und DL 10 waren mit BSE, die Schafe SW 1188, SV 2457, SW 1328, SW 1184 mit Scrapie infiziert.

Im Western-Blot zeigten nur Proben Banden, die im PrionScreen® positiv reagiert hatten. So waren Rahmproben aus Milch, die im PrionScreen® eingesetzt worden und negativ waren, ebenfalls negativ im Western-Blot (Abb. 25 Spur 2 und 10) und auch die Proben aus dem Kontrollpool sowohl von Milch als auch von Kolostrum (Abb. 25 Spur 11 und 12; Abb. 26

Spur 9) wiesen keinerlei Banden auf. Bei einigen der Kolostralproben, die im PrionScreen® positiv reagiert hatten, konnte man allerdings drei Banden auf Höhe von 27-35 kDa sehen, was der Höhe der PrP^C-Isoformen bei gesunden Tieren entspricht. In Abb. 25 sind diese nur schwach, in Abb. 26 jedoch stärker sichtbar. Nun handelt es sich definitionsgemäß nicht um typisches PrP^{res}, da der übliche "Bandenshift", d.h. ein Höhenunterschied von einer nicht mit PK verdauten zu einer PK-verdauten von 27-35 kDa zu ca. 18-29 kDa, fehlt. Während die PK-verdaute Scrapie-Hirnhomogenatkontrolle sich also auf ca. 18-29 kDa befindet, weisen die Rahmproben aus Kolostrum Banden bei 27-35 kDa sowie teilweise eine Bande bei 14 kDa auf.

5 DISKUSSION

Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stellt die Dissertation von BOESEN (2005) aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch dar. Durch die dort beschriebene Etablierung eines Sandwich-EIAs zur Detektion des Prion Proteins in diversen Organen der Wiederkäuer, wurden die Voraussetzungen geschaffen, um in einer Folgestudie Eutergewebe und Milch detailliert zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde - mithilfe neuer, zum Teil optimierter Aufarbeitungsmethoden für PrP - die tierartlich-vergleichende Analyse des Eutergewebes und der verschiedenen Milchfraktionen von Rind, Schaf und Ziege in EIA und Western-Blot durchgeführt. Daten aus der Publikation von DIDIER et al. (2006), die die PrP^C-Expression im Rindereuter beschreiben, wurden zur besseren Darstellung der tierartlichen Unterschiede in den Ergebnisteil dieser Arbeit aufgenommen. Zudem wurden die Ergebnisse der vom Labor von Prof. Amselgruber im Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere der Universität Hohenheim durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung bei Schaf und Ziege eingebracht. Dadurch wurden die Erkenntnisse über die physiologische PrP^C-Expression und Sekretion erheblich erweitert. Die erzielten Ergebnisse könnten auch im Hinblick auf eine mögliche physiologische Funktion von PrP^C im Euter von Interesse sein.

Eine weitere wichtige Bedeutung erhält die PrP^C-Expression jedoch wegen ihrer Vorläufer-Funktion bei der Bildung von PrP^{Sc}. Insofern ist das Vorkommen von PrP^C in Eutergewebe und Milch bedeutend, da nur dann im Falle einer TSE-Infektion und der Ausbreitung des infektiösen Agens bis zum Euter eine Umformung des vorhandenen PrP^C in die pathogene Variante möglich wäre.

5.1 Detektion von PrP^C in Eutergewebe und Milch von Hauswiederkäuern

Im Folgenden soll zunächst auf die Methodik eingegangen werden, mit der Eutergewebe und Milch auf PrP^C hin untersucht wurden. Dabei wird auch diskutiert, inwiefern sie für die auffälligen Ergebnisse verantwortlich sein kann.

Eine Einflussgröße für die Qualität des PrP^C-Nachweises sind die verwendeten Antikörper. Im EIA wie auch im Western-Blot wurde der mAk P4 verwendet. Er wurde wie in Abb. 3 ersichtlich gegen ein N-terminales Epitop der ovinen PrP-Sequenz erzeugt (HARMEYER et al., 1998), detektiert jedoch auch PrP bei Rind und Ziege (HARMEYER et al., 1998; BOESEN, 2005). Hier ist jedoch zu beachten, dass sich die Proteinsequenz des Rindes im

Bereich des P4-Epitopes durch einen Aminosäureaustausch von der des Schafes unterscheidet – ebenso die der Ziege. Dies könnte die Affinität der Bindung und somit die Sensitivität der verwendeten Testsysteme beeinflussen. Der mAk V5B2 wurde in seiner Erstbeschreibung als spezifisch für humanes PrP^{Sc} ausgegeben (ŠERBEC et al., 2004). Die Ergebnisse von BOESEN (2005) zeigten jedoch, dass dieser Antikörper in der Lage ist, PrP^C nachzuweisen – gleichermaßen bei Rind, Schaf und Ziege. Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper können somit nicht der Grund sein, weshalb PrP^C nur in der Milch kleiner Wiederkäuer, nicht jedoch beim Rind detektiert wird. Zumal in Eutergewebe bovines PrP^C von diesen Antikörpern detektiert wurde.

Ein auffälliges Ergebnis, bei dem die Spezifität und Sensitivität der Antikörper möglicherweise eine Bedeutung hat, lieferte die IHC. Hier war PrP^C mit mAk L42 detektierbar bei Schaf und Rind, nicht jedoch bei der Ziege. Wurde allerdings stattdessen mAk P4 zur Detektion verwendet, so war auch im Eutergewebe der Ziege PrP^C nachweisbar. Eine zugrundeliegende Spezies-Spezifität im Epitop des L42 (Abb. 3) direkt kann ausgeschlossen werden, da es im Epitop selbst keine Aminosäureaustausche zwischen Schaf und Ziege gibt. Allerdings ist von einigen Autoren (VACCARI et al., 2002; WU et al., 2004) ein Aminosäureaustausch in unmittelbarer Nachbarschaft des Epitops beschrieben.

Während der Arbeit von BOESEN (2005) eine unabhängige Methode fehlte, um die Ergebnisse des EIA zu verifizieren, konnte dies in der vorliegenden Arbeit durch die Etablierung des Western-Blot für alle Milchfraktionen geleistet werden. Allerdings ist zu bedenken, dass die jeweilige Methode durch eine unterschiedliche Sensitivität gekennzeichnet ist. So liegt die Nachweisgrenze eines Sandwich-EIA für PrP bei ca. 50-100 pg/ml, die eines Western-Blots bei ca. 10 ng/ml (VÖLKE et al., 2003). Der EIA stellt somit die ungefähr 100-mal sensitivere Methode dar. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse zur PrP^C-Expression im Rindereuter sein. So bestätigte der EIA die Ergebnisse der Immunhistochemie, wohingegen im Western-Blot kein Nachweis des zellulären Prion Proteins möglich war.

Ferner mussten –methodisch bedingt - für die Immunhistochemie, den EIA und den Western-Blot unterschiedliche Areale der Euterproben eingesetzt werden. Somit könnte auch das jeweilige lokale Expressionsniveau einen Einfluss auf die Testergebnisse gehabt haben.

Zur besseren Auftrennung der in Milch der kleinen Wiederkäuer entdeckten niedermolekularen PrP^C-Fragmente wurden in der vorliegenden Arbeit Tris-Tricine-Gele im Western-Blot verwendet. Die routinemäßig zur Detektion des Voll-längen-Prion Protein eingesetzten Bis-Tris-Gele bieten keine klare Auflösung im unteren Molekulargewichts-

Bereich. Mithilfe der Tris-Tricine-Gele sollte über eine N-terminale Sequenzierung eine Bestimmung der trunkierten Formen nach Elution der Banden aus dem Gel erfolgen. Es zeigte sich jedoch, dass die Banden nach einer Protein-Färbung mittels Coomassie-Blau nicht eindeutig vom unspezifischen Proteinhintergrund der Probe zu differenzieren waren. Das Blotten auf eine spezielle Polyvinylidendifluorid-Membran, die ebenfalls für N-terminale Sequenzierung geeignet ist, und die anschließende immunologische Detektion mittels P4 brachte ebenfalls nicht die zur Sequenzierung erforderliche Signalstärke. Somit konnte die genaue Sequenz der trunkierten Formen und deren Zuordnung im Gesamtlängen-Protein nicht ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen sich in den Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Literatur folgendermaßen einordnen: Nachdem HORIUCHI et al. (1995) und MOUDJOU et al. (2001) im Schaf qualitativ das Vorkommen von PrP^C im Euter beschrieben haben, zeigten DIDIER et al. (2006) für das Rind und die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für Schaf und Ziege durch den Einsatz der Immunhistochemie auch die Lokalisation des PrP^C auf zellulärer Ebene. Es stellte sich für alle untersuchten Spezies heraus, dass die Laktozyten der einzige Zelltyp der Milchdrüse sind, der PrP^C exprimiert. Allerdings gibt es dabei tierart-spezifische Besonderheiten. Während eine Expression beim Rind nur in aktiv sezernierenden Zellen zu finden war, konnte das zelluläre Prion Protein in Schaf auch in nicht aktiven Zellen detektiert werden. Die für die PrP^C-Expression im Rindereuter widersprüchlichen Ergebnisse zwischen IHC und EIA einerseits und Western-Blot andererseits wurden bereits oben in Zusammenhang mit der Methodik diskutiert.

Bei der Untersuchung von Ziegeneuter mittels Western-Blot fiel eine spezifische Bande bei ca. 95 kDa auf. Hierbei könnte es sich aufgrund der Molekülgröße um ein Trimer von PrP^C handeln. Das Auftreten von Oligomeren wurde vielfach in Zusammenhang mit dem zur Aggregatbildung neigenden PrP^{res} aber auch für rekombinantes Prion Protein sowie für PrP^C beschrieben (MEYER et al., 1986; MA & LINDQUIST, 2001; MORILLAS et al., 2001; GOVAERTS et al., 2004; DEAR et al., 2007; KRISTIANSEN et al., 2007; STROM et al., 2007).

Die immunhistochemisch erzielten Ergebnisse in Schaf- und Ziegeneuter gaben zudem einen ersten Hinweis auf das mögliche Vorkommen von PrP^C in der Milch. Es konnte gezeigt werden, dass PrP^C im Rahmen der apokrinen Sekretion in Vesikeln in die Milch übergeht. Beim Rind war dies aufgrund der vorwiegend basolateralen Proteinexpression nicht der Fall.

Während PrP^C-Expression im Eutergewebe des Schafes bereits seit 1995 (HORIUCHI et al.) belegt war, war über das Vorkommen von PrP^C in Milch lange Zeit keine Literatur vorhanden.

Erst im Rahmen der Entwicklung eines EIA für PrP^C ermöglichte BOESEN (2005) auch die Untersuchung der obengenannten Matrix. Sie konnte PrP^C in Vollmilch von Rind, Schaf und Ziege nachweisen. Diese Ergebnisse konnten, soweit es Schaf und Ziege betrifft, durch die in dieser Arbeit ermittelten Daten in Magermilch und Molke bestätigt werden. Auf den ersten Blick nicht stimmig erscheint dabei zunächst die Tatsache, dass die in der Molke ermittelten EIA-Daten in den meisten Fällen die in Magermilch detektierten Werte übertrafen. Magermilch ist aufgrund der noch vorhandenen Kaseine die proteinreichere Milchfraktion und eine Kaseinfällung hätte eigentlich eine Verminderung des PrP^C-Gehaltes zur Folge haben müssen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass durch die Fällung der Kaseinfraktion Proteine, die den PrP^C-Nachweis in Magermilch erschweren, eliminiert worden sind.

Im Gegensatz zu Schaf- und Ziegenmilch konnte in keiner Probe der untersuchten Kuhmilch mit den hier beschriebenen immunchemischen Methoden PrP^C detektiert werden. Damit stehen die hier vorgelegten Ergebnisse in Kontrast zu kürzlich erschienenen Publikationen (FRANSCINI et al., 2006; MADDISON et al., 2007). In ihnen wurde PrP^C in Kuhmilch nachgewiesen und zwar in einer ungefähr fünffach größeren Menge als in Ziegenmilch (FRANSCINI et al., 2006). Diese Divergenz besonders in Bezug auf Kuhmilch lässt sich vor allem durch ein unterschiedliches methodisches Herangehen erklären. So hat die von FRANSCINI et al. (2006) beschriebene Verwendung der PrioTrap® Adsorptionsmatrix eine starke Aufkonzentrierung der ursprünglichen Proben zur Folge, wodurch die Nachweisgrenze der Detektion vermutlich deutlich gesenkt werden kann. Die Autoren machen jedoch keine Angabe zum Faktor der Aufkonzentrierung. Ferner geht aus der Veröffentlichung von FRANSCINI et al. (2006) nicht genau hervor, welche Milchfraktion für die Detektion verwendet wird. Bei MADDISON et al. (2007) handelt es sich eindeutig um Magermilch. Eine Erfassung des PrP^C-Vorkommens getrennt nach den unterschiedlichen Milchfraktionen – wie hier vorgelegt – erfassen beide Arbeiten nicht. Weshalb PrP^C in Rohmilch von Kühen mit der beschriebenen Methodik nicht nachweisbar war, jedoch deutlich bei Schaf und Ziege, scheint aufgrund des Vergleichs mit den Ergebnissen anderer Autoren mit der offenbar tierartbedingten Menge am ehesten erklärbar. Für Kuhmilch wird sie von FRANSCINI et al. (2006) auf ungefähr 200 pg/ ml geschätzt. Auffällig ist, dass sowohl FRANSCINI et al. (2006) als auch MADDISON et al. (2007) in homogenisierter, pasteurisierter oder ultrahocherhitzer Kuhmilch noch PrP^C feststellen konnten. PrP^C scheint folglich einer gewissen Hitzebehandlung gut standzuhalten und auch nach einer dadurch verursachten Reduktion (MADDISON et al., 2007) noch durch die von den Autoren beschriebenen Methoden nachweisbar zu sein.

Die Untersuchung im Western-Blot verdeutlichte neben der im EIA gefundenen tierart-spezifischen Signalstärke auch ein unterschiedliches Bandenmuster für das zelluläre Prion Protein in kleinen Wiederkäuern.

Auffällig waren die beiden im Western-Blot dargestellten trunkierten Formen bei ca. 8 bzw. 14 kDa in Magermilch, Molke und teilweise auch in somatischen Zellen bei Schaf und Ziege. Es dürfte sich bei ihnen um N-terminale Teilfragmente des Prion Proteins handeln, da der verwendete mAk P4 gegen eine N-terminale Sequenz des Prion Proteins gerichtet ist. In der Literatur wird vereinzelt von trunkierten Formen berichtet. CHEN et al. (1995) beschrieben C-terminale Fragmente in gesunden und CJD-Gehirnen. Ebenso wurden PrP^C-Fragmente in Cerebrospinalflüssigkeit (TAGLIAVINI et al., 1992), Serum (PARIZEK et al., 2001) und Blutplättchen des Menschen (PERINI et al., 1996) beschrieben. Außerdem konnten ECROYD et al. (2004) verschiedene trunkierte Formen im Seminalplasma sowie in der Nebenhodenflüssigkeit von Schafböcken nachweisen. Auch in Milch wurden durch MADDISON et al. (2007) drei N-terminale Fragmente mit Größen zwischen 4 und 10 kDa detektiert. Dazu dienten die mAk AG4, SAF32 und P4, wobei nur letzterer alle Fragmente erkannte. Da mAk P4 auch im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion im Western-Blot eingesetzt wurde, könnte die 8-kDa-Form identisch mit einer der drei von MADDISON et al. (2007) beschriebenen Formen sein.

Einen weiteren, zum Teil unklaren Befund, lieferten die divergierenden Ergebnisse zum PrP^C-Gehalt in den somatischen Zellen der Milch. Diese lassen keine tierartlich vergleichende Aussage zu. Die Verlaufsuntersuchung über die gesamte Laktationsperiode im Schaf zeigte, dass PrP^C in dieser Fraktion nicht zu allen Untersuchungszeitpunkten detektierbar war. Da es sich bei den somatischen Zellen der Milch nicht um eine einheitliche Zellfraktion handelt und die Zusammensetzung sowie der Aktivierungsstatus der Zellen stark von der Laktationsphase und dem aktuellen Gesundheitsstatus der Milchdrüse abhängen (ÖSTENSSON, 1993; LABOHM et al., 1998; LEITNER et al., 2000a; LEITNER et al., 2000b; SCHRÖDER, 2003; RIVAS et al., 2006), wäre dies eine mögliche Erklärung für die variierenden Ergebnisse.

Vor dem Hintergrund der deutlichen tierartlichen Unterschiede bezüglich des Vorkommens von PrP^C in der Milch soll nun versucht werden, die mögliche physiologische Bedeutung dieses Proteins in der Milchdrüse zu erläutern. Hierbei bietet die aus der Literatur bekannte Rolle von PrP^C beim Transport von zweiwertigen Kationen (LASMÉZAS, 2003) einen wichtigen Ansatz. Es konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Form des Prion Protein nicht nur Kupferionen (BROWN et al., 1997; BROWN et al., 2001) sondern auch weitere zweiwertige Metallionen wie Kalzium, Zink und Mangan mit geringerer Affinität (JACKSON et al., 2001; LEACH et al., 2006) bindet. Zudem wurde der Einfluss von PrP^C auf die

Regulation des freien intrazellulären Kalziums (WHATLEY et al., 1995; BRINI et al., 2005) bzw. der Kalziumkonzentration im Endoplasmatischen Retikulum (HETZ et al., 2003) durch verschiedene Ansätze gezeigt. Vergleicht man die Milchinhaltsstoffe der in dieser Arbeit untersuchten Spezies, so findet man vor allem im Bereich der Mineralstoffe und Spurenelemente deutliche tierartliche Unterschiede, wie Tab. 18 zu entnehmen ist. Schafmilch zeigt den höchsten Gehalt aller im Hinblick auf eine mögliche Bindung an PrP^C relevanten zweiwertigen Kationen. Es kann somit vermutet werden, dass PrP^C eine Rolle beim Mineralstoff- und Spurenelement-Transport in die Milch spielt. Eine weitere Beobachtung, die diese Hypothese stützt, ist der Langzeit-Untersuchung der PrP^C-Gehalte im Schaf über die gesamte Laktationsperiode. Deutlich erhöhte Werte im EIA konnten vor allem in der Hochlaktation beobachtet werden, wenn aufgrund der erheblichen Milchmenge der Bedarf an Mineralstoffen und Spurenelementen entsprechend groß ist.

Tabelle 18: Inhaltsstoffe in Wiederkäuermilch nach SOUCI, FACHMANN & KRAUT (2005):

Stoffname	Einheit	Durchschnittlicher Gehalt je 100 g Milch von		
Hauptbestandteile		Rind	Schaf	Ziege
Wasser	g	87,2	82,7	86,6
Protein (N X 6,25)	g	3,26	5,16	3,61
Fett	g	3,78	6,26	3,92
verwertbare Kohlenhydrate	g	4,70	4,70	4,20
Mineralstoffe insgesamt	g	0,74	0,86	0,79
Ausgewählte Mineralstoffe				
Kalzium	mg	120	183	127
Mangan	µg	2,5	6,8	5,5
Kupfer	µg	10	26	11
Zink	µg	380	415	242

5.2 Methodenetablierung der Aufarbeitung von PrP im Rahm und Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Aufarbeitungsverfahren, welche es ermöglicht, die Proteine der Rahmfraction der immunchemischen Detektion zugänglich zu machen, etabliert werden. Dies ist besonders im Rahmen der Prionen-Forschung von Interesse, da die immunhistochemischen Ergebnisse gezeigt haben, dass PrP^C offensichtlich in den membranumschlossenen Lipidvesikeln der Milch vorliegen kann. Eine weitere Arbeitshypothese der hier vorliegenden Dissertation ist, dass aufgrund seiner veränderten biochemischen Eigenschaften (siehe 2.1.1) PrP^{Sc} eventuell eher in der Fettfraktion der Milch zu finden sein könnte. Im Rahmen der Methodenetablierung wurde dazu ein Lipaseverdau mit der von (BASTIAN et al., 2005) beschriebenen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion kombiniert und erfolgreich etabliert. Die obengenannte Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ist ursprünglich vor allen zur Präparation von Nukeinsäuren etabliert worden (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). Die nach der Phasentrennung in der organischen sowie in der Interphase befindlichen Proteine sind allerdings ebenfalls einer weiteren Aufarbeitung und anschließenden Detektion im Western-Blot zugänglich. Bei der Optimierung des Verfahrens konnte gezeigt werden, dass die Protein- und somit die PrP^C-Ausbeute deutlich gesteigert werden konnte, wenn in Abweichung zu BASTIAN et al. (2005) zusätzlich zur organischen Phase auch die Interphase in die Proteinfällung eingesetzt wurde. In diesem Punkt stellte das hier etablierte System eine Verbesserung des oben zitierten Protokolls dar. Weitere Optimierungsversuche mithilfe des Chelatbildners EDTA entsprechend der Protokolle von WADSWORTH et al. (1999), NISHINA et al. (2004) und KUCZIUS et al. (2007) führten nicht zu einer Verbesserung der Signalstärke im Western-Blot. Aus diesem Grunde wurde bei weiteren Arbeiten auf die Zugabe von Chelatbildnern verzichtet.

Mithilfe des neu etablierten Aufarbeitungsverfahrens war es möglich, in der Rahmfraction von Schaf und Ziege PrP^C nachzuweisen.

5.3 Nachweis von PrP^{res} in der Milch von TSE infizierten Schafen

Bei allen Tieren aus dem TSE-Probenpool erfolgte trotz der oben erwähnten Arbeitshypothese eine systematische Untersuchung aller Milchfraktionen (soweit vorhanden). Neben Milchproben konnte von den meisten Tieren auch das Kolostrum untersucht werden.

Es zeigte sich, dass das in der Molke, welche aus Milch gewonnen worden war, vorhandene Prion Protein vollständig PK-sensitiv war. Unterzog man jedoch Molke, die aus Kolostrum stammte, einem PK-Verdau, so zeigte sich eine erhöhte PK-Resistenz des Prion Proteins,

die allerdings nicht mit einem vollständigen Banden-Shift auf die von PrP^{res} zu erwartende Höhe vergesellschaftet war. Auch zeigte sich die trunkierte Form bei 8 kDa PK-resistent. Ähnliche Beobachtungen konnten in der Proteinfraction, die aus Rahm gewonnen wurde, gemacht werden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob der Rahm von Kolostrum oder von Milch stammte.

Da die geeignete PK-Konzentration für einen vollständigen Verdau von den jeweiligen Untersuchungsbedingungen (BARNARD et al., 2000) abhängt, wurde nochmals an dieser Einflussgröße gearbeitet. Es wurde sowohl PK-Konzentration als auch Inkubationszeit erhöht, doch die Banden blieben weiterhin bestehen. Eine eventuell unvollständige PK-Wirkung ohne Banden-Shift musste daher anderweitige Gründe haben. BUSCHMANN et al. (1998) beschrieben eine intrinsische partielle PK-Resistenz des PrP^C, die zu einem intermediär auftretenden Fragment von 25-28 kDa führte und somit PrP^{res} vortäuschte. Da es sich dabei um ein C-terminales Fragment handelt, in dieser Arbeit jedoch ein gegen das N-terminale Ende des PrP^C gerichteter Antikörper verwendet wurde, konnte dieser Fall nicht vorliegen.

Die Kolostrumproben TSE-infizierten Schafe stellten aufgrund der hohen Probenviskosität und des hohen Fettgehaltes eine besondere Herausforderung dar. Sie konnten nicht dem Standardprotokoll für die Molkefällung unterzogen werden, sondern mussten ebenfalls nach der modifizierten Probenaufarbeitung nach BASTIAN et al. (2005) extrahiert werden. Es wurde daher geprüft, ob durch den Einsatz der organischen Lösungsmittel die PK-Aktivität gehemmt wurde. Wurde der PK-Verdau jedoch direkt nach dem Lipase-Verdau vollzogen und dann im Protokoll weiterverfahren, kam es zu keiner Optimierung des Ergebnisse.

Neben der erhöhten Hydrophobizität von PrP^{Sc} ist die schlechte Löslichkeit in milden Detergenzien (MEYER et al., 1986) ein weiteres Charakteristikum dieses Proteins. Somit ist eine möglichst vollständige Probenhomogenisierung von entscheidender Bedeutung für eine optimale Detektion von PrP^{Sc}. Da vor allem der hier verwendete Antikörper P4 in der Arbeit von BOESEN (2005) eine Empfindlichkeit gegen Detergenzien gezeigt hatte, konnten diese nur in begrenztem Maße in der Probenaufarbeitung eingesetzt werden. Zudem war eine optimale Homogenisierung des gewonnen Proteinpellets kaum möglich.

Als weitere Detektionsmethode für PrP^{Sc} kam daher der PrionScreen®-EIA zum Einsatz. Er ist ausschließlich für Hirngewebe von Rindern EU-validiert und kombiniert den Einsatz von Detergenzien mit einer stringenten Probenhomogenisierung mittels Keramik-Beads. Der in diesem Test eingesetzte Fang- sowie der Detektionsantikörper weisen zudem eine höhere Stabilität gegenüber den zu Homogenisierung eingesetzten Detergenzien auf. Beim Einsatz des aufgearbeiteten Rahms im PrionScreen® reagierten 7 von 13 Milchproben aus der

Scrapie-Gruppe und 8 von 108 Milchproben aus der BSE-Gruppe positiv. Bei den positiven Reagenten handelt es sich ausnahmslos um Kolostrumproben. Sie entsprechen einem Anteil von ca. 26 % der insgesamt im PrionScreen® untersuchten Kolostrumproben. Als zusätzliche Kontrolle wurde mit Rahmproben gearbeitet, die zuvor mit Hirnhomogenat eines Scrapie-Schafes dotiert worden waren. Auch sie reagierten deutlich positiv.

Bei den meisten untersuchten Schafen ist mittlerweile eine TSE-Erkrankung belegt. Das aus dem PrionScreen® verbleibende Probenaliquot wurde anschließend zur Bestätigung der Ergebnisse im Western-Blot verwendet. Dabei zeigte sich bei den infizierten Tieren wiederum ein Bandenmuster, welches auf der Höhe des zellulären Prion Proteins verlief. Die Kontrollreaktion mit einem unspezifischen Primärantikörper konnte jedoch nicht einwandfrei die Spezifität der Banden zeigen. Über ein ähnliches Phänomen in der Zellfraktion von Kolostralmilch berichteten EVEREST et al. (2006). In der aktuellen Diskussion gehen die Vermutungen derzeit dahin, dass eine unspezifische Bindung an Fragmente der leichten Ketten von Immunglobulinen für diese unspezifische Hintergrundreaktion verantwortlich sein könnte (Prof. Dr. Martin Groschup – persönliche Mitteilung).

5.4 Ergebnisse bei klinisch erkrankten BSE Rindern

Im Eutergewebe von BSE-Kühen konnte mittels Immunhistochemie kein PrP^{res} detektiert werden. Dies kontrastiert in gewisser Weise die Ergebnisse von LIGIOS et al. (2005). Allerdings ist zu beachten, dass sich die zitierte Studie auf Scrapie-infizierte Schafe mit gleichzeitig vorliegender Mastitis bezieht. Zudem wurde PrP^{Sc} nur in den lymphoiden Strukturen der Milchdrüse nicht aber in den Laktozyten nachgewiesen.

Auch in Magermilch, Molke und Zellen von BSE-Kühen fand sich kein PrP^{res}. Da kein Rahm zur Verfügung stand, fehlt somit eine Fraktion (s. 5.1, 5.2) um eine Gesamtaussage über das Vorkommen von PrP^{res} in Milch von BSE-Kühen zu treffen. Erstaunlicherweise reagierte die Kaseinfraktion der Tiere im PrionScreen® positiv, während sich bei Untersuchungen von gesunden Schafen nur verhältnismäßig wenig PrP^C in dieser Fraktion mittels EIA nachweisen ließ und dies nicht bei allen Tieren (BOESEN, 2005; s. 4.1.2.3). Eine Abklärung dieses Ergebnisses, insbesondere im Hinblick auf unspezifische Reaktionen, war jedoch nicht möglich.

5.5 FAZIT

Die Ergebnisse von den klinisch gesunden Tieren lieferten erstmals einen umfassenden und tierartlich vergleichenden Einblick in die Expression des zellulären Prion Protein im Euter unserer Hauswiederkäuer. Zudem konnte eine Sezernierung des Proteins mit der Milch nachgewiesen werden. Eine derart umfassende Untersuchung der verschiedensten Milchfraktionen sowie eine Langzeitstudie über eine komplette Laktationsperiode hinweg sind in der Literatur nicht beschrieben.

Unter Einbeziehung der bislang bekannten biochemischen und molekularen Eigenschaften von PrP^{Sc} wurde anschließend die Milch und das Eutergewebe von TSE-infizierten Schafen untersucht. Es konnte kein schlüssiger Beweis erbracht werden, dass PrP^{res} in der Milch bzw. im Kolostrum vorliegt. Dennoch kann aufgrund der veränderten PK-Empfindlichkeit der Proben von TSE-Tieren abschließend nicht ausgeschlossen werden, dass hier eine Veränderung auf Proteinebene stattgefunden hat. Aufgrund des geringen Probevolumens, das im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stand, konnten jedoch keine weiteren Untersuchungen im Hinblick auf die Spezifität der PK-resistenten Bande durchgeführt werden. Ebenso wenig konnte Material für einen Bioassay gewonnen werden, um schlussendlich eine Aussage über die potentielle Infektiosität der Proben treffen zu können.

Hierbei stellt die aus dem Rahm gewonnene Proteinfraction den mit Sicherheit interessantesten Teil der Proben dar.

Allerdings muss betont werden, dass die Laktozyten, die den IHC-Resultaten zufolge das PrP^C bilden und in die Milch abgeben, nicht innerviert sind (siehe Kapitel 2.3.4). Insofern fehlt der Weg über periphere Nerven für eine Ausbreitung vom ZNS zum Euter bei TSE-infizierten Tieren. Die bleibenden theoretisch möglichen Übertragungswege stellen somit das Blut und die Lymphe dar, auf deren Möglichkeit als Überträger bereits in Kap. 2.3.3 eingegangen wurde.

Insgesamt ist in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse das Vorkommen von Prion-Infektiosität in Milch und Euter als eher unwahrscheinlich zu beurteilen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersuchte im ersten Teil tierart-vergleichend das Vorkommen von PrP^C bei Hauswiederkäuern in Eutergewebe und in den verschiedenen Milchfraktionen. Dies erfolgte mittels EIA und Western-Blot sowie für das Eutergewebe auch mittels Immunhistochemie (IHC). Für die Aufarbeitung von Rahm wurde dabei ein neues Verfahren etabliert, durch das die Proteinfraction des Rahms als Pellet gewonnen werden konnte. Es fand seinen Einsatz auch im zweiten Teil bei der Untersuchung von Milch und Kolostrum BSE- bzw. Scrapie-infizierter Schafe mittels PrionScreen® und Western-Blot. Auch das Eutergewebe und die Milchfraktionen von drei BSE-Kühen wurden untersucht.

Im Eutergewebe vom Rind war PrP^C-Expression mittels EIA und IHC mit individuellen Unterschieden nachweisbar, nicht jedoch mittels Western-Blot. Bei den kleinen Wiederkäuern hingegen ließ sich PrP^C mit allen drei verwendeten Methoden darstellen. In der IHC zeigte sich, dass die Expression das gesamte Zytoplasma der Laktozyten umfasste und PrP^C-haltige Vesikel ins Alveolarlumen abgeschnürt wurden. Beim Rind dagegen beschränkte sich die PrP^C Expression auf basolaterale Abschnitte der Laktozyten.

In Kuhmilch konnte - im Gegensatz zu kürzlich erschienenen Publikationen - kein PrP^C detektiert werden. Die kleinen Wiederkäuer zeigten jedoch eine individuelle und - wie anhand des Laktationszyklus eines Schafes nachvollziehbar - laktationsphasen-abhängige PrP^C-Expression in den Milchfraktionen Magermilch, Molke und somatische Zellen. Neben den vom Hirngewebe bekannten drei Isoformen (zweifach-, einfach- und unglykosyliert) waren im Western-Blot mit mAk P4 zwei trunkierte Formen auf Höhe von ca. 8 und 14 kDa darstellbar. Dabei handelt sich vermutlich um N-terminale Fragmente. In Kasein war nur bei einigen Schafen PrP^C im EIA nachweisbar. Rahm konnte aufgrund seiner Aufarbeitung mittels Detergentien nur im Western-Blot untersucht werden. Es zeigten sich bei Schaf und Ziege dieselben PrP^C- Banden wie in den bereits beschriebenen Milchfraktionen.

Bei den Proben TSE-infizierter Schafe zeigte sich sowohl bei Rahm aus Milch als auch bei Rahm und Molke aus fettreichem Kolostrum, die eine ähnliche Aufarbeitung erfuhren, PK-resistente Banden. Diese Banden zeigten sich auf Höhe der drei Vollängen-Isoformen sowie der 8-kDa-Form. Eine Abklärung erfolgte im PrionScreen®-EIA durch Einsatz der aus Rahm gewonnenen Proteinpellets. Darin reagierten sieben von 13 Milchproben der Scrapie-Tiere und acht von 108 der BSE-Schafe positiv. Dabei handelte es sich durchweg um Kolostrumproben (etwa 26 % der untersuchten Kolostrumproben). Auch im anschließenden Western-Blot mit einem Aliquot aus der Digestionsplatte des PrionScreen® zeigten sich bei

einem Teil der positiven EIA-Reagenten Banden auf PrP^C-Höhe. Durch die Kontrolle mit einem unspezifischen Primärantikörper konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob die Banden PrP-spezifisch sind. Ein ähnliches Phänomen bei somatischen Zellen aus Schaf-Kolostrum ist von EVEREST et al. (2006) bekannt. Man muss daher davon ausgehen, dass es sich um eine unspezifische Reaktion des Kolostrums handelt. Rahm aus Milch reagierte im PrionScreen® eindeutig negativ, ebenso Molke aus Milch im Western-Blot.

Die Eutergewebeprobe der drei BSE-Kühe reagierten negativ in EIA, Western-Blot und IHC. Auch in ihrer Magermilch war kein PrP^{res} detektierbar. Die Kaseinfraktion reagierte positiv im PrionScreen®, wobei eine unspezifische Reaktion jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte.

Obwohl die Untersuchungen an klinisch gesunden Tieren gezeigt haben, dass PrP^C als Replikationsmatrix für die Bildung von PrP^{Sc} im Euter und der Milch vorhanden ist, brachten die Analysen der TSE-infizierten Tiere letztlich keinen Beweis für das Vorkommen von PrP^{res} in Milch. Lediglich im Kolostrum von TSE-infizierten Schafen zeigten sich untypische PK-resistente Formen. Eine Gefährdung des Verbrauchers durch Milch und Milchprodukte ist daher mit größter Wahrscheinlichkeit nicht gegeben.

SUMMARY

Study on the occurrence of prion proteins in mammary gland tissue and milk of ruminants

The present thesis comparatively analysed in its first part occurrence of PrP^C in udder tissue and milk fractions of domestic ruminants. This was done by the means of EIA, western blot analysis and for mammary gland tissue also by immunohistochemistry (IHC). For cream clean-up, a new method was established which allowed to gain the protein fraction of cream as pellet. It was also used in the second part for analysis of milk and colostrum derived from BSE or Scrapie infected sheep by PrionScreen®-EIA and western blot. Mammary gland tissue and milk fractions of three BSE cows have also been examined.

In mammary gland tissue of cattle, PrP^C expression was detectable by EIA and IHC, showing individual differences, but not by immunoblot. In the small ruminants, however, PrP^C was traceable by all three methods applied. IHC displayed, that PrP^C expression comprised the complete cytoplasm and PrP^C positive particles were secreted into the gland's lumen. In contrast, PrP^C expression in cattle was only localized at basolateral parts of the lactocytes.

In cow's milk, PrP^C was not detectable - in contrast to recently published papers. In small ruminants however, there was an individual and lactation state dependent PrP^C expression – as shown by a follow-up study during the lactation period of one sheep - visible in the milk fractions skimmed-milk, whey and somatic cells. In addition to the three known isoforms from cerebral tissue (bi-, single and unglycosylated) two truncated forms at the level of about 8 and 14 kDa could be demonstrated in western blot by mAb P4. Presumably, they are N-terminal fragments. In casein, PrP^C was detectable by EIA only in some sheep. Cream could only be analysed by immunoblot because of its clean-up with detergents. In sheep and goat, the same PrP^C bands were visible as in the above described milk fractions.

The samples of TSE infected sheep showed after PK digestion residual bands both in cream of milk and in cream and whey of rich colostrum, which underwent a similar treatment. These residual bands appeared at the level of the three common full length PrP^C isoforms and the 8-kDa-form in immunoblot. For clarification, protein pellets obtained from cream clean-up were analysed by PrionScreen®-EIA resulting in 7 of 13 positive milk probes of scrapie and 8 of 108 positive probes from BSE-sheep. Positive results could solely be seen in colostrum samples, altogether about 26 % of the analysed colostrum. In western blot prepared from an aliquot of the PrionScreen® digestion plate, part of the EIA-positive samples showed bands

at the molecular weight of PrP^C as well. It could not be definitely shown that bands are PrP-specific by re-examination with an unspecific primary antibody. A similar phenomenon has been described by EVEREST et al. (2006) in somatic milk cells from ovine colostrum. It is therefore probable that the positive results are based upon an unspecific reaction of colostrum. A clearly negative reaction was seen in milk derived cream and whey by PrionScreen® and western blot.

The samples of udder tissue of three BSE cows arised negative results by EIA, immunoblot and IHC. In skimmed-milk, no PrP^{res} was detectable. The casein fraction showed a positive reaction in PrionScreen® which however could not be confirmed.

Although the present study on clinically healthy animals reveals that PrP^C as replication matrix for PrP^{Sc} forming is present in mammary gland and milk, analysis of TSE animals did not reveal final proof for presence of PrP^{res} in milk. Only for colostrum of TSE-infected sheep, it cannot be totally rouled out that it contains PK resistant forms. A risk forthe consumer by consumption of milk and milk products is therefore not given with the utmost probability.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AGUZZI, A., M. HEIKENWALDER & M. POLYMENIDOU (2007):

Insights into prion strains and neurotoxicity

Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8, 552-561

ALMOND J. & PATTISON J. (1997):

Human BSE

Nature 389, 437-438

ANDRÉOLETTI, O., S. SIMON, C. LACROUX, N. MOREL, G. TABOURET, A. CHABERT, S. LUGAN, F. CORBIÈRE, P. FERRÉ, G. FOUCRAS, H. LAUDE, F. EYCHENNE, J. GRASSI & F. SCHELCHER (2004):

PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie

Nat. Med. 10, 591-593

BAKER, H. E. & R. M. RIDLEY (1996):

Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. Study so far provides no evidence for maternal and horizontal transmission

Brit. Med. J. 312, 843

BARNARD, G., B. HELMICK, S. MADDEN, C. GILBOURNE & R. PATEL (2000):

The measurement of prion protein in bovine brain tissue using different extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE

Luminescence 15, 357-362

BASLER K., B. OESCH, M. SCOTT, D. WESTAWAY, M. WÄLCHLI, D. F. GROTH, M. P.

McKINGLEY, S. B. PRUSINER & C. WEISSMANN (1986):

Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene

Cell 46, 417-428

BASTIAN, F. O., M. E. McDERMOTT, A. S. PERRY, L. A. CARVER, S. DASH & R. F. GARRY (2005):

Safe method for isolation of prion protein and diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease

J. Virol. Methods 130, 133-139

BEEKES, M. & P. McBRIDE (2000):

Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie

Neurosci. Lett. 278, 181-184

BEEKES, M. & P. McBRIDE (2007):

The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies

FEBS J. 274, 588-605

BEEKES, M., E. BALDAUF & H. DIRINGER (1996):

Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie

J. Gen. Virol. 77, 1925-1934

BELT, P. B. G. M., A. BOSSERS, B. E. C. SCHREUDER & M. A. SMITS (1996):

PrP allelic variants associated with natural scrapie

In: GIBBS, C. J. (Hrsg.): Bovine spongiform encephalopathy. The BSE dilemma

Springer, New York, 294-305

Sequenz bei NCBI: CAA04236

BELT, P. B. G. M., I. H. MUILEMAN, B. E. C. SCHREUDER, J. BOSDERUIJTER, A. L. J. GIELKENS & M. A. SMITS (1995):

Identification of 5 allelic variants of the sheep PRP gene and their association with natural scrapie

J. Gen. Virol. 76, 509-717

BERG, L. J. (1994):

Insights into the role of the immune system in prion disease

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 429-432

BÉRINGUE, V., O. ANDRÉOLETTI, A. LE DUR, R. ESSALMANI, J. L. VILOTTE, C. LACROUX, F. REINE, L. HERZOG, A.-G. BIACABÉ, T. BARON, M. CARAMELLI, C. CASALONE & H. LAUDE (2007):

A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission

J. Neurosci. 27, 6965-6971

BOESEN, M. (2005):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von zellulärem Prion Protein bei Wiederkäuern

Diss. med. vet., München

BRAGULLA, H. & H. E. KÖNIG (2005):

Milchdrüse (Mamma)

In: KÖNIG, H. E. & H.-G. LIEBICH (Hrsg.): Anatomie der Haussäugetiere

3. Auflage, Schattauer, Stuttgart, 615-622

BRAUN, U., E. AMREIN, U. ESTERMANN, J. EGL, T. SCHWEIZER, H. LUTZ, F.

EHRENSPERGER, M. VANDERVELDE & U. KIHM (1998b):

182 offspring of cows with spongiform encephalopathy (BSE) in switzerland. 1. clinical findings

Schweiz. Arch. Tierheilkd. 140, 240-249

BRAUN, U., E. SCHICKER, N. PUSTERLA & M. SCHÖNMANN (1998a):

Klinische Befunde bei 50 Kühen mit boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE)

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 111, 27-32

BRINI, M., M. MIUZZO, N. PIEROBON, A. NEGRO & M. C. SORGATO (2005):

The prion protein and its paralogue doppel affect calcium signaling in chinese hamster ovary cells

Mol. Biol. Cell 16, 2799-2808

BROWN, D. R., B. S. WONG, F. HAFIZ, C. CLIVE, S. J. HASWELL & I. M. JONES (1999):

Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase

Biochem. J. 344, 1-5

BROWN, D. R., C. CLIVE & S. J. HASWELL (2001):

Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein

J. Neurochem. 76, 69-76

BROWN, D. R., F. HAFIZ, L. L. GLASSSMITH, B.-S. WONG, I. M. JONES, C. CLIVE & S. J. HASWELL (2000):

Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance

EMBO J. 19, 1180-1186

BROWN, D. R., K. QIN, J. W. HERMS, A. MADLUNG, J. MANSON, R. STROME, E. P. FRASER, T. KRUCK, A. VON BOHLEN, W. SCHULZ-SCHAEFFER, A. GIESE, D. WESTAWAY & H. KRETZSCHMAR (1997):

The cellular prion protein binds copper in vivo

Nature 390, 684-687

BRUCE, M.E., R. G. WILL, J. W. IRONSIDE, I. McCONNELL, D. DRUMMOND, A. SUTTIE, L. McCARDLE, A. CHREE, J. HOPE, C. BIRKETT, S. COUSENS, H. FRASER & C. J. BOSTOCK (1997):

Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent

Nature 389, 498-501

BÜELER H., A. AGUZZI, A. SAILER, R. A. GREINER, P. AUTENRIED, M. AGUET & C. WEISSMANN (1993):

Mice devoid of PrP are resistant to scrapie

Cell 73, 1339-1347

BÜELER H., M. FISCHER, Y. LANG, H. BLUETHMANN, H.-P. LIPP, S. J. DeARMOND, S. B. PRUSINER, M. AGUET & C. WEISSMANN (1992):

Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein

Nature 356, 577-582

BUSCHMANN, A. & M. H. GROSCHUP (2005):

Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle

J. Infect. Dis. 192, 934-942

BUSCHMANN, A., T. KUCZIUS, W. BODEMER & M. H. GROSCHUP (1998):

Cellular prion proteins of mammalian species display an intrinsic partial proteinase K resistance

Biochem. Biophys. Res. Comm. 253, 693-702

CAPLAZI, P., K. O'ROURKE, C. WOLF, D. SHAW & T. V. BASZLER (2004):
Biology of PrP^{Sc} accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks
J. Vet. Diagn. Invest. 16, 489-496

CAPOBIANCO, R., C. CASALONE, S. SUARDI, M. MANGIERI, C. MICCOLO, L. LIMIDO, M. CATANIA, G. ROSSI, G. DI FEDE, G. GIACCONE, M. G. BRUZZONE, L. MINATI, C. CORONA, P. ACUTIS, D. GELMETTI, G. LOMBARDI, M. H. GROSCHUP, A. BUSCHMANN, G. ZANUSSO, S. MONACO, M. CARAMELLI & F. TAGLIAVINI (2007):
Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE?
PloS Pathog. 3 (3): e31. doi: 10.1371/journal.ppat.0030031

CASALONE, C., G. ZANUSSO, P. ACUTIS, S. FERRARI, L. CAPUCCI, F. TAGLIAVINI, S. MONACO & M. CARAMELLI (2004):
Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease
PNAS 101, 3065-3070

CASHMAN, N. R., R. LOERTSCHER, J. NALBANTOGLU, I. SHAW, R. J. KASCSAK, D. C. BOLTON & P. E. BENDHEIM (1990):
Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation
Cell 61, 185-192

CASTILLA, J., A. BRUN, F. DÍAZ-SAN SEGUNDO, F. J. SALGUERO, A. GUTIÉRREZ-ADÁN, B. PINTADO, M. A. RAMÍREZ, L. DEL RIEGO & J. M. TORRES (2005):
Vertical transmission of bovine spongiform encephalopathy prions evaluated in a transgenic mouse model
J. Virol. 79, 8665-8668

CHEN, S. G., D. B. TELOW, P. PARCHI, J. K. TELLER, P. GAMBETTI & L. AUTILIO-GAMBETTI (1995):
Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases
J. Biol. Chem. 270, 19173-19180

CHOMCZYNSKI, P. & N. SACCHI (1987):
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction
Anal. Biochem. 162, 156

COLLING, S. B., M. KHANA, J. COLLINGE & J. G. R. JEFFERYS (1997):
Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice
Brain Res. 755, 28-35

COLLINGE, J. (1997):
Human prion disease and bovine spongiform encephalopathie (BSE)
Hum. Mol. Genet. 6, 1699-1705

COLLINGE, J., K. C. L. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE & A. F. HILL (1996):
Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD
Nature 383, 685-690

COLLINGE, J., M. A. WHITTINGTON, K. C. SIDLE, C. J. SMITH, M. S. PALMER, A. R.
CLARKE & J. G. JEFFEREYS (1994):
Prion protein is necessary for normal synaptic function
Nature 370, 295-297

CRIADO, J. R., M. SANCHEZ-ALVAREZ, B. CONTI, J. L. GIACCHINO, D. N. WILLS, S. J.
HENRIKSEN, R. RACE, J. C. MANSON, B. CHESEBRO & M. B. OLDSTONE (2005):
Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP
in neurons
Neurobiol. Dis. 19, 255-265

CROZET, C., S. LEZMI, F. FLAMANT, J. SAMARUT, T. BARON & A. BENCSIK (2007):
Peripheral circulation of the prion infectious agent in transgenic mice expressing the ovine
prion protein gene in neurons only
J. Infect. Dis. 195, 997-1006

CUILLÉ, J. & P. L. CHELLE (1936):
La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?
C. R. Acad. Sci. Paris 203, 1552-1554

CUILLÉ, J. & P. L. CHELLE (1938):
La tremblante du mouton est bien inoculable
C. R. Acad. Sci. Paris 206, 78-79

DAHMS, S., B. HÖRNLIMANN & J. W. WILESMITH (2001):

Die Ursache der BSE-Epidemie

In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER & H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten

Walter de Gruyter, Berlin, 330-336

DAWSON, M.M., L. J. HOINVILLE, B. D. HOSIE & N. HUNTER (1998):

Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie

Vet. Rec. 142, 623-625

DEAR, D. V., D. S. YOUNG, J. KAZLAUSKAITE, F. MEERSMANN, D. OXLEY, J.

WEBSTER, T. J. PINHEIRO, A. C. GILL, I. BRONSTEIN & C. R. LOWE (2007):

Effects of post-translational modifications on prion protein aggregation and the propagation of scrapie-like characteristics in vitro

Biochim Biophys Acta 1774, 792-802

DeARMOND, S. J., W. C. MOBLEY, D. L. DeMOTT, R. A. BARRY, J. H. BECKSTEAD & S. B. PRUSINER (1987):

Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection

Neurology 37, 1271-1280

DETWILER, L. (2001):

Portrait der Traberkrankheit bei Schaf und Ziege (Scrapie)

In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER & H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten

Walter de Gruyter, Berlin, 165-172

DIDIER, A., R. DIETRICH, M. STEFFL, M. GAREIS, M. H. GROSCHUP, S. MÜLLER-HELLWIG, E. MÄRTLBAUER & W. M. AMSELGRUBER (2006):

Cellular prion protein in the bovine mammary gland is selectively expressed in active lactocytes

J Histochem Cytochem 54, 1255-1261

DRÖGEMÜLLER, C., F. DE VRIES, H. HAMANN & O. DISTL (2003):

PrP-Allelfrequenz-Ermittlung und Simulationsstudien zur Selektion auf Scrapie-Resistenz in deutschen Schafzuchtpopulationen

Züchtungskunde 75, 259-273

ECROYD, H., P. SARRADIN, J.-L. DACHEUX & J.-L. GATTI (2004):

Compartmentalization of prion isoforms within the reproductive tract of the ram

Biol. Reprod. 71, 993-1001

EFSA (2004):

http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/biohaz/biohaz_documentants/709.Par.0002.File.dat/bdoc_statement_goatsmilk_en1.pdf

ENDO, T., D. GROTH, S. B. PRUSINER & A. KOBATA (1989):

Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein

Biochemistry 28, 8380-8388

ESPINOSA, J. C., M. MORALES, J. CASTILLA, M. ROGERS & J. M. TORRES (2007):

Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge

J. Gen. Virol. 88, 1379-1383

EVEREST, S. J., L. T. THORNE, J. A. HAWTHORN, R. JENKINS, C. HAMMERSLEY, A. M. RAMSAY, S. A. HAWKINS, L. VENABLES, L. FLYNN, R. SAYERS, J. KILPATRICK, A. SACH, J. HOPE & R. JACKMAN (2006):

No abnormal prion protein detected in the milk of cattle infected with the bovine spongiform encephalopathy agent

J. Gen. Virol. 87, 2433-2441

FATZER, R., F. EHRENSPERGER, D. HEIM, J. SCHMIDT, A. SCHMITT, U. BRAUN & M. VANDERVELDE (1998): 182 offspring of cows with spongiform encephalopathy (BSE) in Switzerland. 2. Epidemiology and pathological findings

Schweiz. Arch. Tierheilkd. 140, 240-249

FLI (2007):

Liste der nach §17c zugelassenen Mittel/List of certified products pursuant to section 17c Animal Diseases Act; Stand/Updated: 2007-06-19

http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.doc

FOSTER, J. D., D. W. PARNHAM, N. HUNTER & M. BRUCE (2001):

Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission

J. Gen. Virol. 82, 2319-2326

FRANSCINI, N., A. EL GEDAILY, U. MATTHEY, S. FRANITZA, M.-S. SY, A. BÜRKLE, M. GROSCHUP, U. BRAUN & R. ZAHN (2006):

Prion protein in milk

PLoS ONE 1(1):e71. doi:10.1371/journal.pone.0000071

FRASER, H. & A. G. DICKINSON (1973):

Scrapie in mice agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation

J. Comp. Pathol. 83, 29-40

G. A. H. WELLS, S. A. C. HAWKINS, R. B. GREEN, A. R. AUSTIN, I. DEXTER, Y. I. SPENCER, M. C. CHAPLIN, M. J. STACK & M. DAWSON (1998):

Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update

Vet. Rec. 142, 103-106

GALLATI, H. & I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GLOCKSHUBER, R. (2001):

Die biophysikalische Charakterisierung des zellulären Prion-Proteins PrP^C

In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER & H. KETZSCHMAR: Prionen und Prionkrankheiten
Walter De Gruyter Verlag, Berlin/New York, 61-68

GOLDMANN, W., N. HUNTER, J. D. FOSTER, J. M. SALBAUM, K. BEYREUTHER & J. HOPE (1990):

Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2476-2480

GOVAERTS, C., H. WILLE, S. B. PRUSINER & F. E. COHEN (2004):
Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers
PNAS 101, 8324-8347

GRETZSCHEL, A., A. BUSCHMANN, M. EIDEN, U. ZIEGLER, G. LÜHKEN, G. ERHARDT &
M. H. GROSCHUP (2005):
Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small
ruminants by biochemical methods
J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 52, 55-63

GROSCHUP, M. H., B. HÖRNLIMANN & A. BUSCHMANN (2001):
Die „natürliche“ und iatrogene Übertragbarkeit der Prionkrankheiten
In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER & H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und
Prionkrankheiten
Walter de Gruyter, Berlin, 361-370

GROSCHUP, M.H, S. HARMEYER & E. PFAFF (1997):
Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species
J. Immunol. Methods 207, 89-101

GROSVENOR, C. E. & F. MENA (1974):
Neural and Hormonal control of milk secretion and milk ejection
In: LARSON, B. L. & V. R. SMITH (Hrsg.): Lactation: a comprehensive treatise
1. Auflage, Academic Press, New York, S. 227-276

GRUNDMANN, C. & E. LÜCKER (2006):
Die neue Generation von BSE-Schnelltests und ihre Eignung in der
Lebensmittelüberwachung
47. Arbeitstagung DVG Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene 26.-29. September 2006
[http://www.lrz-muenchen.de/~lmhyg.vetmed/DVG_LF_06_Poster_Grundmann_BSE-
Schnelltests.pdf](http://www.lrz-muenchen.de/~lmhyg.vetmed/DVG_LF_06_Poster_Grundmann_BSE-Schnelltests.pdf)

HABERMEHL, K.-H. (2005):

Haut und Hautorgane

In: NICKEL, R., A. SCHUMMER & E. SEIFERLE: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere

Band III Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane

Hrsg.: HABERMEHL, K.H., B. VOLLMERHAUS, H. WILKENS & H. WAIBL

4. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, 443-576

HADLOW, W. J., R. C. KENNEDY & R. E. RACE (1982):

Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus

J. Infect. Dis. 146, 657-664

HARAGUCHI, T., S. FISHER, S. OLOFSSON, T. ENDO, D. GROTH, A. TARENTINO, D. R.

BORCHELT, D. TELOW, L. HOOD, B. W. GIBSON, A. L. BURLINGAME, E. LYCKE, A.

KOBATA & S. B. PRUSINER (1989):

Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion protein

Arch. Biochem. Biophys. 274, 1-13

HARMEYER, S., E. PFAFF & M. H. GROSCHUP (1998):

Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants

J. Gen. Virol. 79, 937-945

HEGGEBO, R., C. MCL. PRESS, G. GUNNES, M. J. ULVUND, M. A. TRANULIS & T.

LANDSVERK (2003):

Detection of PrP^{Sc} in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent

J. Comp. Path. 128, 172-181

HEPPNER, F. L., A. D. CHRIST, M.A. KLEIN, M. PRINZ, M. FRIED, J. P. KRAEHENBUHL &

A. AGUZZI (2001):

Transepithelial prion transport by M cells

Nat. Med. 7, 976-977

HERMS, J. W., T. TINGS, S. DUNKER & H. A. KRETZSCHMAR (2001):

Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar Purkinje cells

Neurobiol. Dis. 8, 324-330

HERMS, J. W., T. TINGS, S. GALL, A. MADLUNG, A. GIESE, P. SCHURMANN, O. WINDL, N. BROSE & H. A. KRETZSCHMAR (1999):

Evidence of pre-synaptic localization and function of the prion protein

J. Neurosci. 19, 8866-8875

HETZ, C., M. RUSSELAKIS-CARNEIRO, K. MAUNDRELL, J. CASTILLA & C. SOTO (2003):

Caspase-12 and endoplasmatic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathologic prion protein

EMBO J. 22, 5435-5445

HETZELT, H. A. (2005):

Entwicklung eines Biosensors zum simultanen Nachweis von Mikroorganismen und Toxinen

Diss. med. vet., München

HILL, A. F., M. DESBRUSLAIS, S. JOINER, K. C. L. SIDLE, I. GOWLAND & J. COLLINGE (1997):

The same prion strain causes vCJD and BSE

Nature 389, 448-450

HILLS, D., S. COMINCINI, J. SCHLAEPFER, G. DOLF, L. FERRETTI & J. L. WILLIAMS (2001):

Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promotor region

Animat. Genet. 32, 231-233

Sequenz bei NCBI: CAC37367

HOFFMANN, C., U. ZIEGLER, A. BUSCHMANN, A. WEBER, L. KUPFER, A.

OELSCHLEGEL, B. HAMMERSCHMIDT & M. H. GROSCHUP (2007):

Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy

J. Gen. Virol. 88, 1048-1055

HOLLMANN, K. H. (1974):

Cytology and fine structure of the mammary gland in differentt species

In: LARSON, B. L. & V. R. SMITH (Hrsg.): Lactation: a comprehensive treatise

1. Auflage, Academic Press, New York, 3-95

HORIUCHI, M., N. YAMAZAKI, T. IKEDA, N. ISHIGURO & M. SHINAGAWA (1995):
A cellular form of prion protein (PrP^C) is present in many non-neuronal tissue of sheep
J. Gen. Virol. 76, 2583-2587

HÖRNLIMANN, B. & P. INFANGER (2001):
BSE-Bekämpfung zum Schutz der Verbraucher und der Tierpopulation: international zu
empfehlende Maßnahmen
In: HÖRNLIMANN, B., D. RIESNER & H. KRETZSCHMAR (Hrsg.): Prionen und
Prionkrankheiten
Walter de Gruyter, Berlin, 470-493

HOUSTON, E. F. & M. B. GRAVENOR (2003):
Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE
Vet. Rec. 152, 333-334

HOUSTON, F., J. D. FOSTER, A. CHONG, N. HUNTER & C. J. BOSTOCK (2000):
Transmission of BSE by blood transfusion in sheep
Lancet 256, 999-1000

HUANG, F. P., C. F. FARQUHAR, N. A. MABBOTT, M.E. BRUCE & G. G. MACPHERSON
(2002).
Migrating intestinal dendritic cells transport PrP^{Sc} from the gut
J. Gen. Virol. 83, 267-271

HUNTER, N., D. CAIRNS, J. D. FOSTER, G. SMITH, W. GOLDMANN & K. DONELLY
(1997):
Is scrapie solely a genetic disease?
Nature 386, 137

HUNTER, N., J. D. FOSTER, W. GOLDMANN, M. J. STEAR, J. HOPE & C. BOSTOCK
(1996):
Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes
Arch. Virol. 141, 809-824

HUNTER, N., J. FOSTER, A. CHONG, S. MCCUTCHEON, D. PARNHAM, S. EATON, C. MACKENZIE & F. HOUSTON (2002):

Transmission of prion diseases by blood transfusion

J. Gen. Virol. 83, 2897-2905

IWATA, N., Y. SATO, Y. HIGUCHI, K. NOHTOMI, N. NAGATA, H. HASEGAWA, M. TOBIUME, Y. NAKAMURA, K. HAGIWARA, H. FURUOKA, M. HORIUCHI, Y. YAMAKAWA & T. SATA (2006):

Distribution of PrP^{Sc} in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan

Jpn. J. Infect. Dis. 59, 100-107

JACKSON, G. S., I. MURRAY, L. L. HOSSZU, N. GIBBS, J. P. WALTHO, A. R. CLARKE & J. COLLINGE (2001):

Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein

PNAS 98, 8531-8535

JEFFREY, M., S. RYDER, S. MARTIN, S. A. C. HAWKINS, L. TERRY, C. BERTHELIN-BAKER & S. J. BELLWORTHY (2001):

Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera

J. Comp. Path. 124, 280-289

JONES, C. E., M. KLEWPATINOND, S. R. ABDELRAHEIM, D. R. BROWN & J. H. VILES (2005):

Probing copper²⁺ binding to the prion protein using diamagnetic nickel²⁺ and ¹H NMR: the unstructural N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations

J. Mol. Biol. 346, 1393-1407

KIMBERLIN R. H. & C.A. WALKER (1989):

Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection

Virus. Res. 12, 213-220

KORTH, C., B. STIERLI, P. STREIT, M. MOSER, O. SCHALLER, R. FISCHER, W. SCHULZ-SCHAEFFER, H. KRETZSCHMAR, A. RAEBER, U. BRAUN, F. EHRENSPERGER, S. HORNEMANN, R. GLOCKSHUBER, R. RIEK, M. BILLETER, K. WÜTHRICH & B. OESCH (1997):

Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody
Nature 390, 74-77

KRETZSCHMAR, H. A. (2002):

Ätiologie, Pathologie und Diagnostik der Prionkrankheiten des Menschen
Internist 43, 716-730

KRETZSCHMAR, H. A., S. B. PRUSINER, L. E. STOWRING & S. J. DeARMOND (1986):

Scrapie prion proteins are synthesized in neurons
Am. J. Pathol. 122, 1-5

KRETZSCHMAR, H. A., T. TINGS, A. MADLUNG, A. GIESE & J. HERMS (2000):

Function of PrP^C as a copper-binding protein at the synapse
Arch. Virol. 16, 239-249

KRISTIANSEN, M., P. DERIZOITIS, D. E. DIMCHEFF, G. S. JACKSON, H. OVAA, H. NAUMANN, A. R. CLARKE, F. W. VAN LEEUWEN, V. MENÉNDEZ-BENITO, N. P. DANTUMA, J. L. PORTIS, J. COLLINGE & S. J. TABRIZI (2007):

Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome
Mol. Cell. 26, 175-188

KUCZIUS, T. & M. H. GROSCHUP (1999):

Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains
Mol. Med. 5, 406-418

KUCZIUS, T., B. BRINKMANN & J. GRASSI (2007):

Immunoreactivity enhancement with chelators for increasing the detection sensitivity of human PrP^{Sc} by western blotting
Neurochem. Int. 50, 102-108

KURZHALS, P., H. KLIMA & D. MANZ (1985):

Beziehung zwischen Zellzahl, Zellbild und bakteriologischen Befunden bei der subklinischen Mastitis des Rindes

Milchwissensch. 40, 6-9

KUWAHARA, C., A. M. TAKEUCHI, T. NISHIMURA, K. HARAGUCHI, A. KUBOSAKI, Y. MATSUMOTO, K. SAEKI, T. YOKOYAMA, S. ITOHARA, T. ONADERA (1999):

Prions prevent neuronal cell-line death

Nature 400, 225-226

LABOHM, R., E. GÖTZ, G. LUHOFER, R.G. HESS & H. BOSTEDT (1998):

Factors influencing the somatic milk-cell-count in dairy cows. 1. Influence of bacteriological findings, stage and number of lactation

Milchwissensch. 53, 63-66

LAINÉ, J., M. E. MARC, M. S. SY & H. AXELRAD (2001):

Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum

Eur. J. Neurosci. 14, 47-56

LANGEDIJK, J. P. M., G. FUENTES, R. BOSHUIZEN & A. M. J. J. BONVIN (2006):

Two-rung model of a left-handed β -helix for prions explains species barrier and strain variation in transmissible spongiform encephalopathies

J. Mol. Biol. 360, 907-920

LASMÉZAS C.I. (2003):

Putative function of PrP^C

Br. Med. Bull. 66, 61-70

LASMÉZAS C.I., J.-P. DESLEYS, R. DEMAIMAY, K.T. ADJOU, F. LAMOURY; D. DORMONT, O. ROBAIN, J. IRONSIDE & J.-J. HAUW (1996):

BSE transmission to macaques

Nature 381, 743-744

LASMÉZAS, C. I., J.-P. DESLEYS, O. ROBAIN, A. JAEGLY, V. BERINGUE, J.-M. PEYRIN, J.-G. FOURNIER, J.-J. HAUW, J. ROSSIER & D. DORMONT (1997):

Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein
Science 275, 402-405

LEACH, S. P., M. D. SALMAN & D. HAMAR (2006):

Trace elements and prion diseases: a review of the interactions of copper, manganese and zinc with the prion protein

Anim. Health Res. Rev. 7, 97-105

LEE, C.-S., F. B. P. WOODING & P. KEMP (1980):

Identification, properties, and differential count of all populations using electron microscopy of dry cow secretions, colostrum and milk from normal cows

J. Dairy Res. 47, 39-50

LEITNER, G., E. SHOSHAN, O. KRIFUCKS, M. CHAFFER & A. SARAN (2000a):

Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology

J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 47, 581-589

LEITNER, G., M. CHAFFER, O. KRIFUCKS, A. GLICKMAN, E. EZRA & A. SARAN (2000b):

Milk leucocyte population in heifers free of udder infection

J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 47, 133-138

LI, A. & D. A. HARRIS (2005):

Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast

J. Biol. Chem. 280, 17430-17434

LIEBICH, H.-G. (2004):

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere

4. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, 323-327

LIEMANN, S. & R. GLOCKSHUBER (1998):

Transmissible spongiform encephalopathies

Biochem. Biophys. Res. Commun. 250, 187-193

LIGIOS, C., C. J. SIGURDSON, C. SANTUCCIU, G. CARCASSOLA, G. MANCO, M. BASAGNI, C. MAESTRALE, M. G. CANCEDDA, L. MADAU & A. AGUZZI (2005):
PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis
Nat. Med. 11, 1137-1138

LLEWELYN, C. A., P. E. HEWITT, R. S. KNIGHT, K. AMAR, S. COUSENS, J. MACKENZIE & R. G. WILL (2004):
Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion
Lancet 363, 417-421

LÓPEZ GARCÍA, F., R. ZAHN, R. RIEK & K. WÜTHRICH (2000):
NMR structure of the bovine prion protein
PNAS 97, 8334-8339

LYSEK, D. A., C. SCHORN, L. G. NIVON, V. ESTEVE-MOYA, B. CHRISTEN, L. CALZOLAI, C. V. SCHROETTER, F. FIORITO, T. HERRMANN, P. GÜNTERT & K. WÜTHRICH (2005):
Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep
PNAS 102, 640-645

MA, J. & S. LINDQUIST (2001):
Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14955-14960

MADDISON, B. C., G. C. WHITELAM & K. C. GOUGH (2007):
Cellular prion protein in ovine milk
Biochem. Biophys. Res. Commun. 353, 195-199

MAIGNIEN, T., C.I. LASMEZAS, V. BERINGUE, D. DORMONT & J.-P. DESLEYS (1999):
Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents
J. Gen. Virol. 80, 3035-3042

MAIGNIEN, T., M. SHAKWEH, P. CALVO, D. MARCÉ, N. SALÈS, E. FATTAL, J.-P. DESLEYS, P. COUVREUR & C.I. LASMÉZAS (2005):
Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE
Int. J. Pharm. 298, 293-204

MALLUCCI, G. R., S. RATTE, E. A. ASANTE, J. LINEHAN, I. GOWLAND, J. G. JEFFERYS & J. COLLINGE (2002):
Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration
EMBO J. 21, 202-210

MANSON, J., J. HOPE, A. R. CLARKE, A. JOHNSTON, C. BLACK & N. MacLEOD (1995):
PrP gene dosage and long term potentiation
Neurodegeneration 4, 113-114

MAYER, G. & M. KLEIN (1961):
Histology and cytology of the mammary gland
In: KON, S. K. & A. T. COWIE (Hrsg.): Milk: the mammary gland and its secretion
1. Auflage, Academic Press, New York, 47-126

McBRIDE, S. M. (2005):
Prion protein: a pattern recognition receptor for viral components and uric acid responsible for the induction of innate and adaptive immunity
Med. Hypotheses 65, 570-577

McKINGLEY, M. P., D. C. BOLTON & S. B. PRUSINER (1983):
A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion
Cell 35, 57-62

MERZ, P. A., R. A. SOMMERVILLE, H. M. WISNIEWSKI & K. IQBAL (1981):
Abnormal fibrils from scrapie-infected brain
Acta Neuropathol. 54, 63-74

MEYER, R. K., M. P. MCKINGLEY, K. A. BOWMAN, M. B. BRAUNFELD, R. A. BARRY & S. B. PRUSINER (1986):

Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins

Proc. Natl. Acad. SCI. USA 83, 2310-2314

MICHEL, G. & J. SCHULZ (1987):

Zur Histologie und Histochemie des Epithels der grossen Milchgänge und Milchzisterne unter besonderer Beachtung ihrer Funktion im System der lokalen Abwehrmechanismen des Rindereuters

Schweiz. Arch. Tierheilk. 129, 319-326

MICHEL, G. (1979):

Zum Bau der Milchgänge des Rindereuters

Mh Vet-Med 34, 133-137

MIDDLETON, D. J. & R. M. BARLOW (1993):

Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneural tissues of affected cattle

Vet. Rec. 132, 545-547

MILHAVET, O. & S. LEHMANN (2002):

Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies

Brain Res. Rev. 38, 328-339

MILLER, R. H., M. J. PAAPE & L. A. FULTON (1991):

Variation in milk somatic cells of heifers at first calving

J. Dairy Sci. 74, 3782-3790

MILLHAUSER, G. L. (2007):

Copper and the prion protein: methods, structures, function, and disease

Annu. Rev. Phys. Chem. 58, 299-320

MIRONOV JR., A., D. LATAWIEC, H. WILLE, E. BOUZAMONDO-BERNSTEIN, G. LEGNAME, R. A. WILLIAMSON, D. BURTON, S. J. DeARMOND, S. B. PRUSINER & P. J. PETERS (2003):

Cytosolic prion protein in neurons

J. Neurosci. 23, 7183-7193

MORILLAS, M., D. L. VANIK & W.K. SUREWICZ (2001):

On the mechanism of alpha-helix to beta-sheet transition in the recombinant prion protein

Biochemistry 40, 6982-6987

MOUDJOU, M., Y FROBERT, J GRASSI & C. LA BONADIÈRE (2001):

Cellular prion status in sheep: tissue-specific biochemical signatures

J. Gen. Virol. 82, 2017-2024

MOYA, K. L., N. SALES, R. HASSIG, C. CREMINON, J. GRASSI & L. DI GIAMBERARDINO (2000):

Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain

Microsc. Res. Tech. 50, 58-65

NICKERSON, S. C. (1994):

A review. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis

Agri-Practice 15, 10-18

NISHINA, K., S. JENKS & S. SUPATTAPONE (2004):

Ionic strength and transition metals control PrP^{Sc} protease resistance and conversion-inducing activity

J. Biol. Chem. 279, 40788-40794

NONNO, R., E. ESPOSITO, G. VACCARI, M. CONTE, S. MARCON, M. DI BARI, C. LIGIOS, G. DI GUARDO & U. AGRIMI (2003):

Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep

J. Clin. Microbiol. 41, 4127-4133

O' ROURKE, K. I., T. V. BASZLER, J. M. MILLER, T. R. SPRAKER, I. SADLER-RIGGLEMAN & D. P. KNOWLES (1998):

Monoclonal antibody F89/106.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein
J. Clin. Microbiol. 36, 1750-1755

O' ROURKE, K. I., T. V. BASZLER, T. E. BESSER, J. M. MILLER, R. C. CUTLIP, G. A. H. WELLS, S. J. RYDER, S. M. PARISH, A. N. HAMIR, N. E. COCKETT, A. JENNY & D. P. KNOWLES (2000):

Preclinical diagnosis of Scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue
J. Clin. Microbiol. 38, 3254-3259

O'DOHERTY, E., A. HEALY, M. AHERNE, J. P. HANRAHAN, E. WEAVERS, M. DOHERTY, J. F. ROCHE, M. GUNN & T. SWEENEY (2002):

Prion protein (PrP) gene polymorphisms associated with natural scrapie cases and their flock-mates in Ireland
Res. Vet. Sci. 73, 243-250

OESCH, B., D. WESTAWAY, M. WÄLCHLI, M. P. McKINGLEY, S. B. H. KENT, R. AEBERSOLD, R. A. BARRY, P. TEMPST, D. B. TELOW, L. E. HOOD, S. B. PRUSINER & C. WEISSMANN (1985):

A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30
Cell 40, 735-746

ÖSTENSSON, K. (1993):

Variations during lactation in total and differential leukocyte counts, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, antitrypsin and serum albumin in foremilk and residual milk from non-infected quarters in the bovine

Acta Vet. Scand. 34, 83-98

PAAPE, M. J., W. P. WERGIN, A. J. GIUDRY & R. E. PEARSON (1979):

Leukocytes – Second line of defense against invading mastitis pathogens
J. Dairy Sci. 62, 135-153

PAAPE, M. J., W. P. WERGIN, A. J. GIUDRY & W. D. S. CHULTZE (1981):

Phagocytic defense of the ruminant mammary gland
Adv. Exp. Med. Biol. 137, 555-578

PAN, K.M., M. BALDWIN, J. NGUYEN, M. GASSET, A. SERBAN, D. GROTH, I. MEHLHORN, Z. HUANG, R. J. FLETTERICK, F. E. COHEN & S. B. PRUSINER (1993):
Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10962-10966

PARIZEK, P., C. ROECKL, J. WEBER, E. FLECHSIG, A. AGUZZI & A. J. RAEGER (2001):
Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells
J. Biol. Chem. 276, 44627-44632

PAULY, P. C. & D. A. HARRIS (1998):
Copper stimulates endocytosis of the prion protein
J. Biol. Chem. 273, 33107-33110

PEDEN, A. H., M. W. HEAD, D. L. RITCHIE, J. E. BELL & J. W. IRONSIDE (2004):
Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient
Lancet 364, 527-529

PERINI, F., R. VIDAL, B. GHETTI, F. TAGLIAVINI, B. FRANGIONI and F. PRELLI (1996):
PRP₂₇₋₃₀ is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets
Biochem. Biophys. Res. Comm. 223, 572-577

PERRY, V. H., C. CUNNINGHAM & D. BOCHE (2002):
Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease
Curr. Opin. Neurol. 15, 349-354

PRUSINER, S. B., M. P. McKINGLEY, D. F. GROTH, K. A. BOWMAN, N. I. MOCK, S. P. COCHRAN & F. R. MASIARZ (1981):
Scrapie agent contains a hydrophobic protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6675-6679

PRUSINER, S.B. (1982):
Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie
Science 216, 136-144

PRUSINER, S.B. (1991):

Molecular biology of prion diseases

Science 252, 1515-1522

PRUSINER, S.B. (1997):

Prion diseases and the BSE crisis

Science 278, 245-251

PRUSINER, S.B. (1998):

Prions

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13363-13383

PRUSINER, S.B., M. P. McKINGLEY, K. A. BOWMANN, D. C. BOLTON, P. E. BENDHEIM, D. F. GROTH & G. G. GLENNER (1983):

Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods

Cell 35, 349-358

RICHT, J. A., P. KASINATHAN, A. N. HAMIR, J. CASTILLA, T. SATHIYASEELAN, F.

VARGAS, J. SATHIYASEELAN, H. WU, H. MATSUSHITA, J. KOSTER, S. KATO, I. ISHIDA, C. SOTO, J. M. ROBL & Y. KUROIWA (2007):

Production of cattle lacking prion protein

Nat. Biotechnol. 25, 132-138

RIDLEY, R. M. (1995):

The myth of maternal transmission of spongiform encephalopathy

Brit. Med. J. 311, 1071-1075

RIEK, R., S. HORNEMANN, G. WIDER, R. GLOCKSHUBER & K. WÜTHRICH (1997):

NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, *mPrP*(23-231)

FEBS Lett. 413, 282-288

RIESNER, D. (2003):

Biochemistry and structure of PrP^C and PrP^{Sc}

Br. Med. Bull. 66, 21-33

RIVAS, A- L., R. TADEVOSYAN; R. C. GOREWIT, K. L. ANDERSON, R. LYMAN & R. N. GONZÁLEZ (2006):

Relationships between the phagocytic ability of milk macrophages and polymorphonuclear cells and somatic cell counts in uninfected cows

Can. J. Vet. Res. 70, 68-74

RIVERA-MILLA, E., B. OIDTMANN, C. H. PANAGIOTIDIS, M. BAIER, T. SKLAVIADIS, R. HOFFMANN, Y. ZHOU, G. P. SOLIS, C. A. STUERMER & E. MALAGA-TRILLO (2006):

Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons

FASEB J. 20, 317-319

ROUCOU, X. & A. C. LeBLANC (2005):

Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases

J. Mol. Med. 83, 3-11

RUDD, P.M., T. ENDO, C. COLOMINAS, D. GROTH, S.F WHEELER, D.J. HARVEY, M.R. WORMALD, H. SERBAN, S. B. PRUSINER, A. KOBATA & R. A. DWEK (1999):

Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms

PNAS 96, 13044-13049

SALÈS, N., R. HASSIG, K. RODOLFO, L. DI GIAMBERARDINO, E. TRAIFFORT, M. RUAT, P. FRETIER & K. L. MOYA (2002):

Development expression of the cellular prion protein in elongating axons

Eur. J. Neurosci. 15, 1163-1177

SCHAMS, D. (1983):

Milchbildung

In: GRAEVERT, H.O. (Hrsg.): Die Milch: Erzeugung, Gewinnung, Qualität

Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 139-164

SCHÄTZL, H. M., M. DA COSTA, L. TAYLOR, F. E. COHEN & S. B. PRUSINER (1995):

Prion protein gene variation among primates

J. Mol. Biol. 245, 362-374

SCHMITT-ULMS, G., G. LEGNAME, M. A. BALDWIN, H. L. BALL, N. BRADON, P. J. BOSQUE, K. L. CROSSIN, G. M. EDELMANN, S. J. DeARMOND, F. E. COHEN & S. B. PRUSINER (2001):

Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein

J. Mol. Biol. 314, 1209-1225

SCHRÖDER, A. (2003):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von zellulärem Prion Protein bei Wiederkäuern

Diss. med. vet., Hannover

SCHULZ-SCHAEFFER, W. J., R. FATZER, M. VANDEVELDE & H. A. KRETZSCHMAR (2000):

Detection of PrP (Sc) in subclinical BSE with the Paraffin-embedded tissue (PET) blot

Arch. Virol. Suppl. 16, 173-180

ŠERBEC, V. Č., M. BRESJANAC, M. POPOVIĆ, K. P. HARTMAN, V. GALVANI, R.

RUPREHT, M. ČERNILEC, T. VRANAC, I. HAFNER & R. JERALA (2004):

Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jakob`s Disease-affected and normal brain tissue

J. Biol. Chem. 279, 3694-3698

SHMERLING, D., I. HEGYI, M. FISCHER, T. BLÄTTLER, S. BRANDNER, J. GÖTZ, T.

RÜLICHE, E. FLECHSIG, A. COZZIO, C. VON MERING, C. HANGARTNER, A. AGUZZI & C. WEISSMANN (1998):

Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions

Cell 93, 203-214

SOUCI, S.W., W. FACHMANN & H. KRAUT (2005):

Food composition and nutrition tables

6ed., Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, Germany,

STAHL, N., D. R. BORCHELT, K. HSIAO & S. B. PRUSINER (1987):

Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid

Cell 51, 229-240

STAHL, N., M. A. BALDWIN, D. B. TEFLOW, L. HOOD, B. W. GIBSON, A. L. BURLINGAME & S. B. PRUSINER (1993):

Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing

Biochemistry 32, 1991-2002

STÖCKEL, J., J. SAFAR, A. C. WALLACE, F. E. COHEN & S. B. PRUSINER (1998):

Prion protein selectively binds copper(II) ions

Biochemistry 37, 7185-7193

STROM, A., G.-S. WANG, R. REIMER, D. T. FINEGOOD & F. W. SCOTT (2007):

Pronounced cytosolic aggregation of cellular prion protein in pancreatic β -cells in response to hyperglycemia

Lab. Invest. 87, 139-149

TAGLIAVINI, F., F. PRELLI, M. PORRO, M. SALMONA, O. BUGIANI & B. FRAGNIONI (1992):

A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies

Biochem. Biophys. Res. Comm. 184, 1398-1404

TAMAI, Y., H. KOJIMA, R. KITAJIMA, F. TAGUCHI, Y. OHTANI, T. KAWAGUCHI, S. MIURA, M. SATO & Y. ISHIHARA (1992):

Demonstration of the transmissible agent in tissue from a pregnant woman with Creutzfeldt-Jakob disease

New England Journal of Medicine 327, 649

TARABOULUS, A., K. JENDROSKA, D. SERBAN, S.-L. YANG, S. J. DeARMOND & S. B. PRUSINER (1992):

Regional mapping of prion protein in brain

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7620-7624

TARABOULUS, A., M. SCOTT, A. SEMENOV, D. AVRAHAM, L. LASZLO & S. B. PRUSINER (1995):

Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform

J. Cell. Biol. 129, 121-132

TATZELT, J. & H. M. SCHÄTZL (2007):

Molecular basis of cerebral neurodegeneration in prion diseases

FEBS J. 274, 606-611

TAYLOR, D. M., C. E. FERGUSON, C. J. BOSTOCK & M. DAWSON (1995):

Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy

Vet. Rec. 136, 592

TERRY, L. A., S. MARSH, S. J. RYDER, S. A. C. HAWKINS, G. A. H. WELLS & Y. I. SPENCER (2003):

Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy

Vet. Rec. 152, 387-392

THOMZIG, A., C. KRATZEL, G. LENZ, D. KRÜGER & M. BEEKES (2003):

Widespread PrP^{Sc} accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie

EMBO Rep. 4, 530-533

THURING, C. M. A., L. J. M. VAN KEULEN, J. P. M. LANGEVELD, M. E. W. VROMANS, F. G. VAN ZIJDERVELD & T. SWEENEY (2005):

Immunohistochemical distinction between preclinical bovine spongiform encephalopathy and scrapie infection in sheep

J. Comp. Path. 132, 59-69

TICHOPAD, A., M. W. PFAFFL & A. DIDIER (2003):

Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR

Mol. Cell Probes 17, 1869-1879

TOBLER, I., S. E. GAUS, T. DEBOER, P. ACHERMANN, M. FISCHER, T. RÜLICHE, M. MOSER, B. OESCH, P. A. McBRIDE & J. C. MANSON (1996):
Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein
Nature 380, 639-642

TOBLER, I., T. DEBOER & M. FISCHER (1997):
Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice
J. Neurosci. 17, 1869-1879

TURK, E., D. B. TELOW, L. E. HOOD & S. B. PRUSINER (1988):
Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins
Eur. J. Biochem. 176, 21-30

TYSHENKO, M. G. (2007):
Bovine spongiform encephalopathy and the safety of milk from Canadian dairy cattle
Vet. Rec. 160, 215-218

VACCARI, G., L. MORELLI, G. ANTONUCCI & U. AGRIMI (2002):
unpublished; direct submitted to NCBI
Sequenz bei NCBI: AAL93182

VAN KEULEN, L. J. M., B. E. C. SCHREUDER, M. E. W. VROMANS, J. P. M. LANGEVELD & M. A. SMITS (1999):
Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie
J. Comp. Path. 121, 55-63

VAN KEULEN, L. J. M., M. E. W. VROMANS, F.G. VAN ZIJDERVELD (2002):
Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep
APMIS 110, 23-32

VASSALLO, N. & J. HERMS (2003):
Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse
J. Neurochem. 86, 538-544

VETRUGNO, V. (2004):

Safety of milk and milk derivatives in relation to BSE: the lactoferrin example

Biomaterials. 17, 353-356

VEY, M., S. PILKUHN, H. WILLE, R. NIXON, S. J. DeARMOND, E. J. SMART, R. G. W. ANDERSON, A. TARABOULUS & S. B. PRUSINER (1996):

Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14945-14949

VILES, J. H., F. E. COHEN, S. B. PRUSINER, D. B. GOODIN, P. E. WRIGHT & H. J. DYSON (1999):

Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2042-2047

VÖLKEL, D., K. ZIMMERMANN, A. BREITWIESER, S. PABLE, M. GLATZEL, F.

SCHLEIFLINGER, H. P. SCHWARZ, M. SARA, U. B. SLEYTR & F. DORNER (2003):

Immunochemical detection of prion protein on dipsticks prepared with crystalline bacterial cell-surface layers

Transfusion 43, 1677-1682

WADSWORTH, J. D. F., A. F. HILL, S. JOINER, G. S. JACKSON, A. R. CLARKE & J. COLLINGE (1999):

Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions

Nat. Cell Biol. 1, 55-59

WAGGONER, D. J., B. DRISALDI, T. B. BARTNIKS, R. L. B. CASARENO, J. R.

PROHASKA, J. D. GITLIN & D. A. HARRIS (2000):

Brain copper content and cuporezyme activity do not vary with prion protein expression level

J. Biol. Chem. 275, 7455-7458

WECHSELBERGER, C., S. WURM, W. PFARR & O. HÖGLINGER (2002):

The physiological functions of prion protein

Exp. Cell Res. 281, 1-8

WELLS, G. A. H., J. SPIROPOULOS, S. A. C. HAWKINS & S. J. RYDER (2005):
Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in
tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle
Vet. Rec. 156, 401-407

WELLS, G. A., A. C. SCOTT, C. T. JOHNSON, R. F. GUNNING, R. D. HANCOCK, M.
JEFFREY, M. DAWSON & R. BRADLEY (1987):
A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle
Vet. Rec. 121, 419-420

WESTERGARD, L., H. M. CHRISTENSEN & D. A. HARRIS (2007):
The cellular prion protein (PrP^C): Its physiological function and role in disease
Biochim Biophys Acta 1772, 629-644

WESTERMEIER, R. (1990):
Elektrophorese-Praktikum
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 56

WEVER, P. & U. EMANUELSON (1989):
Effects of systematic and intramammary infection on differential and total systematic cell
counts in quarter milk samples from dairy cows
Acta vet. scand. 30, 465-474

WHATLEY, S. A., J. F. POWELL, G. POLITOPOLOU, I. C. CAMPBELL, M. J. BRAMMER &
N. S. PERCY (1995):
Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein
Neuroreport 6, 2333-2337

WILESMITH, J. W. & J. B. M. RYAN (1997b):
Absence of BSE in the offspring of pedigree suckler cows affected by BSE in Great Britain
Vet Rec 141, 250-251

WILESMITH, J. W., G. A. H. WELLS, J. B. M. RYAN, D. GAVIER-WIDEN & M. M. SIMMONS (1997a):

A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy

Vet. Rec. 141, 239-243

WILESMITH, J. W., G. A. H. WELLS, M. P. CRANWELL & J. B. M. RYAN (1988):

Bovine spongiform encephalopathy: Epidemiological studies

Vet. Rec. 123, 638-644

WOOD, J. N. L., S. H. DONE, G. C. PRITCHARD & M. J. A. WOOLDRIDGE (1992):

Natural scrapie in goats: case histories and clinical signs

Vet. Rec. 131, 66-68

WOPFNER, F., G. WEIDENHOFER, R. SCHNEIDER, A. VON BRUNN, S. GILCH, T. F. SCHWARZ, T. WERNER & H. M. SCHATZL (1999):

Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein

J. Mol. Biol. 289, 1163-1178

Sequenz bei NCBI: AAD19987

WU, R., Q. G. XIE, X. T. LIU & H. T. CHEN (2004):

Cloning and sequence analysis of prion protein (PrPC) genes from sheep and goat unpublished; direct submitted to NCBI

Sequenzen bei NCBI: AAU02121; AAU02122; AAU02123

ZAHN, R., A. LIU, T. LÜHRS, R. RIEK, C. VON SCHROETTER, F. LÓPEZ GARCÍA, M. BILLETER, L. CALZOLAI, G. WIDER & K. WÜTHRICH (2000):

NMR solution structure of the human prion protein

PNAS 97, 145-150

ZIEGLER, H. & W. MOSIMANN (1960):

Anatomie und Physiologie der Rindermilchdrüse

Paul Parey Verlag, Berlin

8 ANHANG

Tabelle 19: Übersicht über die gelieferten Proben und Untersuchungsergebnisse der Scrapie-Gruppe

Proben-Nr.	Material	Bemerkung	infiziert	Status	Ergebnisse			
					Western-Blot Molke	Western-Blot Rahm	PrionScreen® Rahm	Western-Blot Rahm nach PrionScreen®
SV 2340	Kolostrum	sehr dickflüssig	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	fraglich	positiv	n. d.
SV 2457	Kolostrum	sehr dickflüssig; keine Molke, geronnen	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	n. d.	fraglich	positiv	fraglich
SW 1174	Kolostrum	sehr dickflüssig, kaum Rahmschicht	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	negativ	negativ	positiv	n. d.
SW 1184	Kolostrum		ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	fraglich	positiv	fraglich
SW 1184	Milch		ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	negativ	negativ	negativ
SW 1188	Kolostrum		ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	fraglich	positiv	fraglich
SW 1220	Kolostrum	rötlich	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	negativ	negativ	negativ	n. d.
SW 1245	Kolostrum	zähflüssig	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	fraglich	negativ	n. d.
SW 1313	Kolostrum	sehr dickflüssig, keine Rahmschicht, keine Molkefällung möglich	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
SW 1314	Kolostrum	sehr dickflüssig	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	n. d.	fraglich	positiv	n. d.
SW 1318	Kolostrum	keine Molke, geronnen	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	n. d.	fraglich	negativ	n. d.
SW 1318	Milch		ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	n. d.	negativ	n. d.
SW 1326	Milch		ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	n. d.	negativ	n. d.
SW 1328	Kolostrum	zähflüssig	ja	klinisch erkrankt; getötet; IHC positiv	fraglich	fraglich	positiv	negativ

Tabelle 20: Übersicht über die gelieferten Proben und Untersuchungsergebnisse der BSE-Gruppe

Proben-Nr.	Material	Bemerkung	infiziert	Status	Ergebnisse			
					Western-Blot Molke	Western-Blot Rahm	PrionScreen® Rahm	Western-Blot Rahm nach PrionScreen®
DL 1	Kolostrum	sehr dickflüssig	ja		fraglich	fraglich	positiv	n. d.
DL 1	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n. d.
DL 9	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n. d.
DL 10	Kolostrum	Vollmilch sehr zähflüssig, fast keine Molke abnehmbar	ja		fraglich	fraglich	positiv	fraglich
DL 10	Milch		ja		negativ	n. d.	negativ	nicht auswertbar
DL 12	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n. d.
DL 18	Kolostrum		ja		fraglich	fraglich	negativ	n. d.
DL 18	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n. d.
DL 19	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n. d.
DL 19	Milch		ja		fraglich	negativ	negativ	n. d.
DL 20	Kolostrum	sehr dickflüssig	ja		fraglich	fraglich	n.d	n.d
DL 20	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n. d.
DL 22	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n. d.
DL 22	Milch		ja		negativ	negativ	n.d	n.d
DL 29	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n. d.
DL 29	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n. d.
DL 32	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n. d.
DL 32	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n. d.
DL 37	Kolostrum		ja		negativ	n. d.	negativ	n. d.
DL 37	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n. d.
DL 40	Kolostrum	fast keine Molkefällung möglich	ja		fraglich	n. d.	negativ	n. d.
DL 40	Milch		ja		fraglich	nicht auswertbar	negativ	n. d.

Proben-Nr.	Material	Bemerkung	infiziert	Status	Ergebnisse			
					Western-Blot Molke	Western-Blot Rahm	PrionScreen® Rahm	Western-Blot Rahm nach PrionScreen®
DL 43	Kolostrum		ja	durch Unfall verletzt; getötet	negativ	n. d.	negativ	n. d.
DL 43	Milch		ja	durch Unfall verletzt; getötet	negativ	fraglich	n.d	n.d
DL 46	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	positiv	n.d
DL 46	Milch	deutlicher Bodensatz	ja		negativ	nicht auswertbar	negativ	n.d
DL 50	Kolostrum		ja		negativ	n. d.	negativ	n.d
DL 50	Milch		ja		negativ	negativ	n.d	n.d
DL 53	Kolostrum		ja		negativ	n. d.	negativ	nicht auswertbar
DL 53	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 58	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n.d
DL 58	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 63	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 66	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n.d
DL 66	Milch		ja		fraglich	fraglich	n.d	n.d
DL 67	Kolostrum		ja		nicht auswertbar	n. d.	negativ	nicht auswertbar
DL 67	Milch	Vollmilch bräunlich; fast keine Molke- fällung möglich	ja		fraglich	fraglich	negativ	n.d
DL 71	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
DL 74	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 76	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
DL 82	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 85	Kolostrum	Vollmilch rötlich	ja		negativ	n. d.	positiv	n.d
DL 85	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 88	Kolostrum		ja		fraglich	fraglich	negativ	nicht auswertbar
DL 88	Milch		ja		fraglich	fraglich	negativ	n.d

Proben-Nr.	Material	Bemerkung	infiziert	Status	Ergebnisse			
					Western-Blot Molke	Western-Blot Rahm	PrionScreen® Rahm	Western-Blot Rahm nach PrionScreen®
DL 93	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n.d
DL 93	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
DL 96	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 98	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 106	Kolostrum		ja		fraglich	negativ	negativ	nicht auswertbar
DL 106	Milch		ja		fraglich	fraglich	negativ	nicht auswertbar
DL 112	Kolostrum	keine Molke, geronnen	ja		n.d.	fraglich	negativ	negativ
DL 112	Milch	Vollmilch leicht blutig; kein blutiger Bodensatz nach Zentrifugation	ja		negativ	fraglich	n.d.	n.d
DL 114	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
DL 116	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 117	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DL 122	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DT 005	Kolostrum		ja		nicht auswertbar	n. d.	positiv	n.d
DT 005	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
DT 007	Kolostrum		ja		nicht auswertbar	n. d.	negativ	n.d
DT 007	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
DT 008	Kolostrum		ja	klinisch	fraglich	fraglich	negativ	n.d
DT 008	Milch		ja	klinisch	fraglich	negativ	negativ	n.d
DT 63	Kolostrum		ja		fraglich	fraglich	negativ	n.d
DT 63	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
DT 90	Kolostrum		ja	klinisch; IHC positiv	fraglich	n. d.	negativ	n.d
DT 90	Milch		ja	klinisch; IHC positiv	negativ	negativ	negativ	n.d

Proben-Nr.	Material	Bemerkung	infiziert	Status	Ergebnisse			
					Western-Blot Molke	Western-Blot Rahm	PrionScreen® Rahm	Western-Blot Rahm nach PrionScreen®
DT 150	Kolostrum		ja	klinisch; IHC fraglich	fraglich	n. d.	negativ	n.d
DT 150	Milch		ja	klinisch; IHC fraglich	negativ	n. d.	negativ	n.d
DT 176	Kolostrum	fast keine Molkefällung möglich	ja	klinisch; IHC positiv	negativ	negativ	negativ	n.d
DT 176	Milch		ja	klinisch; IHC positiv	negativ	n. d.	negativ	n.d
DT 230	Kolostrum		ja	klinisch; IHC positiv	fraglich	n. d.	negativ	n.d
DT 236	Kolostrum	fast keine Molkefällung möglich	ja	klinisch; IHC positiv	negativ	n. d.	negativ	n.d
DT 992	Kolostrum		ja	klinisch; IHC positiv	fraglich	fraglich	negativ	negativ
DT 992	Milch		ja	klinisch; IHC positiv	fraglich	fraglich	negativ	n.d
DT 993	Kolostrum		ja	klinisch; IHC positiv	fraglich	fraglich	positiv	fraglich
DT 993	Milch		ja	klinisch; IHC positiv	negativ	fraglich	n.d	n.d
DT 995	Kolostrum		ja		negativ		negativ	n.d
DT 995	Milch		ja		fraglich	fraglich	negativ	n.d
DT 996	Kolostrum		ja	klinisch; IHC positiv	fraglich	n. d.	negativ	n.d
DT 998	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar
K 462	Kolostrum		nein		fraglich	n. d.	negativ	n.d
K 462	Milch		nein		negativ	negativ	negativ	n.d
K 514	Milch		nein		negativ	negativ	negativ	n.d

Proben-Nr.	Material	Bemerkung	infiziert	Status	Ergebnisse			
					Western-Blot Molke	Western-Blot Rahm	PrionScreen® Rahm	Western-Blot Rahm nach PrionScreen®
SSO 748	Kolostrum		nein	klinisch verdächtig	negativ	n. d.	negativ	n.d
SSO 748	Milch		nein	klinisch verdächtig	negativ	n. d.	negativ	n.d
SSO 751	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
SSO 752	Kolostrum		nein		fraglich	fraglich	negativ	n.d
SSO 752	Milch		nein		negativ	negativ	negativ	n.d
SSO 753	Kolostrum		ja	klinisch verdächtig	fraglich	n. d.	negativ	n.d
SSO 753	Milch		ja	klinisch verdächtig	negativ	negativ	negativ	n.d
SSO 754	Kolostrum		nein		fraglich	n. d.	negativ	n.d
SSO 754	Milch		nein		negativ	fraglich	negativ	n.d
SSO 755	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n.d
SSO 755	Milch		ja		fraglich	negativ	negativ	n.d
SSO 758	Kolostrum		nein		fraglich	fraglich	negativ	negativ
SSO 758	Milch		nein		fraglich	negativ	negativ	negativ
SSO 770	Kolostrum		nein		fraglich	n. d.	negativ	nicht auswertbar
SSO 770	Milch		nein		fraglich	fraglich	negativ	n.d
SSO 782	Kolostrum		nein		negativ	n. d.	negativ	n.d
SSO 782	Milch		nein		fraglich	negativ	negativ	n.d
SSO 800	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	negativ	n.d
SSO 800	Milch		ja		fraglich	negativ	negativ	n.d
SSO 802	Kolostrum		ja	tot aufgefunden; negativ	fraglich	n. d.	negativ	nicht auswertbar
SSO 802	Milch		ja	tot aufgefunden; negativ	fraglich	fraglich	negativ	n.d
T 1713	Kolostrum		nein		negativ	n. d.	negativ	n.d
T 1714	Kolostrum		ja		fraglich	n. d.	positiv	fraglich
T 1714	Milch		ja		fraglich	negativ	negativ	n.d

Proben-Nr.	Material	Bemerkung	infiziert	Status	Ergebnisse			
					Western-Blot Molke	Western-Blot Rahm	PrionScreen® Rahm	Western-Blot Rahm nach PrionScreen®
T 1715	Kolostrum	sehr dickflüssig, fast keine Rahmschicht; fast keine Molke	ja		fraglich	n. d.	negativ	nicht auswertbar
T 1715	Milch	fast keine Rahmschicht	ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
T 1716	Milch		ja		negativ	negativ	negativ	n.d
T 1717	Kolostrum	sehr dickflüssig	ja		fraglich	n. d.	positiv	n.d
T 1717	Milch		ja		negativ	fraglich	negativ	n.d
T 1719	Kolostrum	sehr dickflüssig, fast keine Rahmschicht	nein		fraglich	fraglich	n.d.	n.d.
T 1722	Milch		nein		negativ	negativ	negativ	n.d
T 1723	Kolostrum		nein		fraglich	n. d.	negativ	n.d
T 1723	Milch	sehr dickflüssig, fast keine Rahmschicht; fast keine Molke	nein		negativ	nicht auswertbar	negativ	n.d

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. E. Märtlbauer möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung und die Möglichkeit danken, in Istanbul und Garmisch meine Ergebnisse zu präsentieren.

Frau Dr. A. Didier und Herrn Dr. R. Dietrich danke ich sehr für die stets gewährte Unterstützung, die hervorragende Betreuung und die hilfreichen Anregungen.

Für die Überlassung der Proben möchte ich Frau Dr. S. Bellworthy vom VLA sowie den verschiedenen Tierhaltern und Schlachtbetrieben danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Amselgruber und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen der gesunden Tiere.

Ebenfalls sei Herrn Professor Dr. M. Groschup für die Immunhistochemie der infizierten Kühe und die Zusendung von Material gedankt.

Großen Dank gilt auch Herrn Dr. P. Hloch und Frau S. Brendel von Roche für die Bereitstellung des PrionScreen® und die Hilfe bei dessen Durchführung danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau M. Straka für die exzellente technische Unterstützung bedanken und bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für deren Hilfe mit kleinen und großen Tipps, die den Laboralltag erleichtern, und das freundliche Arbeitsklima. Auch allen ehemaligen und aktuellen Doktoranden ein herzliches Dankeschön für das gute Miteinander.

Last but not least möchte ich Emanuel von Herzen für die Geduld und Unterstützung danken, die er mir während dieser Zeit entgegengebracht hat.

LEBENS LAUF

Name: Ricarda Gebert

Geburtsdatum: 22.04.1980

Geburtsort: Heilbronn-Neckargartach

Familienstand: ledig

Adresse: Marktstr. 8, 74592 Kirchberg/Jagst

Eltern: Heinz Gebert, Zimmermeister i. R.
Gerlinde Gebert, geb. Hofmann, kaufm. Angestellte i. R.

Schulbildung: 1986-1990 Sonnenberg-Grundschule Schwaigern
1990-1999 Gymnasium Eppingen; Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr: 1999-2000 im Mobilen Sozialen Dienst der AWO Ulm

Studium: 2000-2006 Studium der Tiermedizin an der
Ludwigs-Maximilians-Universität München
03/2003-07/2003 Auslandssemester als Erasmus-Studentin an
der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich

Staatsexamen: 07.03.2006

Approbation: 16.03.2006

Promotionsstudium: seit 04/2006 am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der
Milch der tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-
Universität München

Berufliche Tätigkeit: 05/2006-05/2007: wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für
Hygiene und Technologie der Milch der tierärztlichen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

10/2007-heute: amtliche Tierärztin des Landkreises
Schwäbisch Hall in den Fleischhygienestellen Crailsheim und
Schwäbisch Hall